

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“DETECCIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 EN CANALES
BOVINAS DE CAMALES DE LIMA”**

TESIS

Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Carmen Rosa Astuvilca Cupe

Lima-Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 118-EAPMV/FMV-2015

PRESIDENTE :
MIGUEL ANGEL VILCA LÓPEZ

MIEMBROS :
JUAN RAÚL LUCAS LÓPEZ
Asesor de la Tesis

:
CÉSAR GAVIDIA CHUCÁN

:
SIEVER MORALES CAUTI

San Borja, 29 de setiembre de 2015

V° B°

.....
MV. Mg. HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO
Directora de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día martes 29 de setiembre de 2015, a las 12:00 horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 118-EAPMV/FMV-2015, integrado por los siguientes profesores:

MIGUEL ANGEL VILCA LÓPEZ	Presidente del Jurado
JUAN RAÚL LUCAS LÓPEZ	Asesor de la Tesis
CÉSAR GAVIDIA CHUCÁN	Miembro del Jurado
SIEVER MORALES CAUTI	Miembro del Jurado

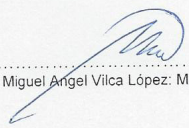
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **ASTUVILCA CUPE, CARMEN ROSA**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

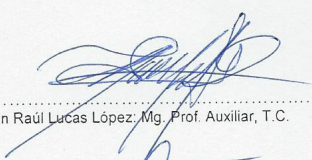
"DETECCIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 EN CANALES BOVINAS DE CAMALES DE LIMA"


Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

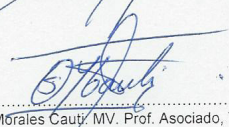
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:10 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Miguel Ángel Vilca López: Mg. Prof. Principal, D.E.


Juan Raúl Lucas López: Mg. Prof. Auxiliar, T.C.


César Gavidia Chucán: Ph.D. Prof. Asociado, D.E.


Siever Morales Cauti: MV. Prof. Asociado, T.P.



DEDICATORIA

A Dios, quien me dio las fuerzas
para seguir adelante en este
camino y me bendijo en todo
momento, gracias padre.

A mis padres, Juan y Fidela,
quienes se sacrificaron por mí,
dándome lo mejor y guiándome
con sus consejos.

A mis hermanos, Juan y Germán,
quienes me apoyaron en toda la
carrera.

A mi novio, Jesús, quien estuvo
apoyándome día a día,
brindándome su comprensión y
amor.

A mis bebes, Grieko y Jeyca, que
me hacen feliz con sus locuras.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a Juan Raúl Lucas López por su acertada dirección y asesoramiato en el desarrollo del presente trabajo.

A los doctores del laboratorio de Salud Pública y Salud ambiental: Dr. Miguel Vilca y Dra. Daphne Ramos.

Al estudio Con con 130801101 de la UNMSM, “Determinación del punto crítico de la contaminación con *Escherichia coli* productora de toxina shiga durante el proceso de beneficio de vacunos en camales de Lima Metropolitana”, por permitirme realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Siever Morales y Dr. Cesar Gavidia por sus consejos y recomendaciones brindados después del desarrollo del presente trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1. Generalidades de <i>E. coli</i>	3
2.1.2. Características morfológicas y bioquímicas de <i>E. coli</i>	6
2.1.2.1. Características morfológicas.....	6
2.1.2.2. Características bioquímicas.....	8
2.1.3. Serotipos de <i>E. coli</i>	11
2.1.4. Patotipos de <i>E. coli</i>	12
2.1.4.1. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica (ECET).....	13
2.1.4.2. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (ECEP).....	14
2.1.4.3. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (ECEA).....	14
2.1.4.4. <i>Escherichia coli</i> entero difusa adherente (ECDA)...	14
2.1.4.5. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (ECEI).....	14
2.2. <i>Escherichia coli</i> productor de toxina shiga (STEC).....	15
2.2.1. Shigatoxinas.....	16
2.2.1.1 Shigatoxina 1.....	17
2.2.1.2 Shigatoxina 2.....	17
2.2.2. Patogénesis.....	18
2.2.3. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (ECEH) y el serotipo O157:H7	19
2.2.3.1. Patogenicidad.....	21
2.3. Epidemiología.....	24
2.3.1. Reservorios de STEC O157:H7.....	24
2.3.2. Fuentes de transmisión de STEC O157:H7.....	26
2.3.3. Dosis infecciosa de STEC O157:H7.....	27
2.4. STEC y su problemática en Salud Pública.....	27

2.4.1. STEC O157:H7 en plantas de procesamiento de carne.....	27
2.4.2. STEC en carnes y sus productos.....	28
2.4.3. Incidencia de STEC en carnes en el Perú.....	30
2.4.4. STEC en productos no cárnicos.....	30
2.4.4.1. STEC O157:H7 en vegetales y frutas.....	30
2.4.4.2. STEC en leche y productos procesados.....	31
2.4.4.3. STEC en aguas.....	31
2.5. STEC en humanos.....	32
2.5.1. Casos de <i>E. coli</i> O157:H7 en humanos en el Perú.....	35
2.6. STEC en animales.....	36
2.7. Consumo de carne de bovino y producción en el país.....	36
2.8. Métodos de detección de STEC en alimentos.....	37
2.8.1. Cultivo bacteriano e identificación bioquímica.....	37
2.8.2. Aglutinación.....	37
2.8.3. ELISA.....	38
2.8.4. PCR.....	38
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1. Lugar de estudio y tiempo.....	41
3.2. Tamaño muestral y toma de muestra.....	41
3.3. Procesamiento microbiológico y bioquímico de las muestras.....	44
3.4. Procesamiento de las cepas mediante PCR.....	44
3.4.1. Extracción del ADN por la técnica de ebullición.....	45
3.4.2. PCR múltiple.....	45
3.4.3. Electroforesis.....	48
3.5. Cepa positiva a STEC O157:H7.....	48
3.6. Análisis de resultados.....	48
IV. RESULTADOS.....	50
V. DISCUSIÓN.....	55
VI. CONCLUSIONES.....	63
VII. LITERATURA CITADA.....	64

RESUMEN

Las *E. coli* productoras de tipo shiga (STEC) son patógenas en el hombre y pueden provocarle colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Dentro de este grupo, el serotipo *E. coli* O157:H7 es el que más se ha reportado como problema de salud pública. Las infecciones por este agente generalmente se producen por consumir alimento contaminado, siendo la carne de bovino el principal vehículo de este patógeno, en el Perú se ha reportado que es causante de diarreas y hospitalizaciones en niños. El objetivo del estudio es identificar la presencia de *E. coli* O157:H7 productora de toxinas shiga en canales de bovinos faenados en Lima. Para ello se recolectaron 180 muestras de 2 mataderos de Lima en 2 momentos del oreo; momento lavado (final del lavado e inicio de oreo) y momento oreo (2-3 h. en la playa de oreo). Se emplearon 2 metodologías, una técnica estándar para *E. coli* que requiere de medios tripticasa de soya (37°C por 24 h) y agar Mac conkey (37°C por 24 h) y una técnica microbiológica específica para la detección de *E. coli* no fermentadoras de sorbitol (característica de la *E. coli* O157:H7) usando los medios específicos EC con novobiocina (37°C por 24 h) y agar Mac conkey sorbitol (37°C por 24 h). Las colonias compatibles con *E. coli* se confirmaron con pruebas bioquímicas, luego se guardó a 2 °C una cepa de cada placa positiva para posteriormente y en conjunto realizar un PCR múltiple con la finalidad de identificar los factores de virulencia Stx1, Stx2, eaeA, rfbO157, hlyA y fliCH7. No se detectó *E. coli* O157:H7. Se encontró 29.4% (53/180) *E. coli* positivos, 5.6% (10/180) STEC, 1.1% (2/180) *E. coli* O157 y 0.5% (1/180) STEC O157. No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre la presencia de agentes (*E. coli* y STEC) y el momento de muestreo; ni con algunas de las técnicas microbiológicas. Los resultados obtenidos muestran la presencia de *E. coli* en las canales bovina desde su procesamiento primario, en los mataderos evaluados.

Palabras claves: cepas, diarrogénicas, PCR, oreo, enfermedades transmitidas por alimentos

ABSTRACT

Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) are pathogenic in humans and it can cause them hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. Within this group, *E. coli* serotype O157: H7 is the most widely reported as a public health problem. Infections by this agent are generally produced by consuming contaminated food, being beef the main vehicle for this pathogen. In Peru it has been reported to be causing diarrhea and hospitalizations in children. The aim of the study is to identify the presence of *E. coli* O157: H7 shiga toxin-producing in cattle carcasses of slaughtered in Lima. For this purpose, 180 samples were collected of 2 slaughterhouses in Lima in 2 times of oreo; washing time (end of washing and beginning of oreo) and oreo time (2-3 h. in oreo). 2 methodologies were used, a standard technique for *E. coli*, which requires trypticase soy media (37°C for 24 h) and Mac Conkey agar (37°C for 24 h) and a specific microbiological technique for detecting *E. coli* non fermenting sorbitol (characteristic of *E. coli* O157: H7) using EC medium with specific novobiocina (37°C for 24 h) and Mac Conkey sorbitol agar (37°C for 24 h). Compatible colonies with *E. coli* were confirmed by biochemical tests, then stored at 2 °C one isolate from each positive plate, later and together make a multiple PCR for the purpose of identify virulence factors Stx1, Stx2, eaeA, rfbO157, hlyA and fliCH7. *E. coli* O157: H7 wasn't detected. It was detected 29.4% (53/180) positive *E. coli*, 5.6% (10/180) STEC, 1.1% (2/180) *E. coli* O157 and 0.5% (1/ 180) STEC O157. No significant difference ($p>0.05$) was found between the presence of agents (*E. coli* y STEC) and the sampling time neither with some microbiological techniques. The results show the presence of *E. coli* in cattle from its primary processing, in slaughterhouses evaluated.

Keywords : strains, diarrheagenic, oreo, foodborne diseases

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes usados en el PCR múltiple 1.....	46
Cuadro 2. Componentes usados en el PCR múltiple 2.....	46
Cuadro 3. Cebadores usados en PCR múltiple para la detección de patotipos <i>Escherichia coli</i> (STEC y EHEC O157:H7) presentes en el proceso de beneficio bovino (Mori, 2013).....	47
Cuadro 4. Tabla de contingencia de las variables canales positivas a <i>E. coli</i> mediante la metodología de MAC y SMAC en centros de beneficio de bovinos en Lima.....	51
Cuadro 5. Tablas de contingencia de las variables canales positivas a STEC mediante la metodología de MAC y SMAC en centros de beneficio de bovinos en Lima.....	52
Cuadro 6. Caracterización mediante PCR múltiple de las cepas positivas de <i>E. coli</i> presentes en canales de bovinos beneficiados en Lima.....	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Puntos anatómicos tomados en el hisopado de las canales bovinas A: toma de muestra en región cervical; B: toma de muestra en región pectoral; C: toma de muestra en región abdominal; D: toma de muestra en región del miembro superior. 43
- Figura 2.** Frecuencia de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* productora de toxina tipo shiga (STEC) en canales bovinas en dos momentos de la playa de oreo: LAVADO (al final del lavado e inicio de oreo) y OREO (2-3 h en la playa de oreo)..... 51
- Figura 3.** Gel agarosa del análisis del PCR múltiple de las cepas de *E. coli*, presentes en las canales de bovinos beneficiados en Lima..... 53

I. INTRODUCCIÓN

La bacteria *Escherichia coli* es un componente importante de la microflora intestinal de los humanos y mamíferos de sangre caliente. Aunque normalmente coloniza inofensivamente el tracto intestinal, varias cepas han adquirido la habilidad de causar una variedad de enfermedades dentro y fuera del tracto intestinal.

Escherichia coli es considerada comensal, es decir que reside en el intestino sin ser dañina para el animal hospedador. Solo una pequeña proporción de cepas son patógenas y está clasificada dentro de categorías o patotipos, basados en la producción de factores de virulencia.

Dentro de los patotipos tenemos: *Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP), *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET), *Escherichia coli* Enteroinvasiva (ECEI), *Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA), *Escherichia coli* Entero difusa adherente (ECDA) y *E. coli* productora de shigatoxinas (STEC) o *E. coli* productora de Verotoxinas (VTEC), la cual posee el subtipo *Escherichia coli* Enterohemorrágica (ECEH).

Las infecciones por *Escherichia coli* pueden ser limitadas a la superficie de la mucosa o pueden ser diseminadas a través de todo el cuerpo. El patotipo STEC es el más importante puesto que ha ocasionado los mayores y más letales brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Dentro de las ECEH existe una cepa muy importante dentro del ámbito de salud pública, la *E.coli* Enterohemorrágica O157:H7, reconocida como causante de muchos brotes de infecciones humanas. Las complicaciones que provoca esta bacteria principalmente son el síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería, siendo los niños el grupo poblacional más afectado.

Los rumiantes, especialmente los bovinos, constituyen un reservorio vasto de STEC. Los principales vehículos por los cuales este patógeno llega al hombre pueden ser: la carne, vegetales, lácteos y el agua. Por tanto, la infección humana con frecuencia se debe al consumo y manejo de estos alimentos contaminados.

Esta bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente en base a sus características bioquímicas o serológicas; pero también se pueden estudiar sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares y técnicas de biología molecular (PCR) que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos. El propósito de detectar la presencia de *E. coli* O157:H7 se basa en fines epidemiológicos; es decir, evidenciar y confirmar los reservorios de este importante patógeno en una determinada área geográfica, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar su presencia en la canal del bovino, en su procesamiento primario en los mataderos de Lima.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Generalidades de *E. coli*

En 1885, el bacteriólogo alemán Theodor Escherich aisló de una muestra de heces una bacteria llamada *Bacteria coli*, la cual años más tarde sería conocida como *Escherichia coli*, y se considera como un importante descubrimiento para la salud pública (Casellas, 2011).

Esta bacteria pertenece a la familia Enterobacteriaceae dentro de ésta existen más de 40 géneros y 180 especies bien definidas. En esta familia, las especies *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* son las más frecuentes causantes de infecciones urinarias en humanos, las cepas de *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. son los agentes etiológicos más importantes en casos de neumonía y todas las enterobacterias están implicadas en infecciones intra-abdominales y bacteriemias. Los géneros *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *E. coli* son conocidos en todo el mundo como causantes de gastroenteritis (Casellas, 2011).

El término coliforme o bacteria coliforme no tiene significancia taxonómica, pero son usadas para referir a estos miembros de las Enterobacteriaceae que usualmente fermentan lactosa como la *Escherichi coli*, *klebsiella* y *Enterobacter* (Markey *et al.*, 2013).

Tradicionalmente el género y la especie han sido distinguidos bioquímicamente y esto es conveniente para la identificación de casos clínicos (Markey *et al.*, 2013).

Clasificación taxonómica de *E. coli* (Extraído de Vadillo *et al.*, 2002)

✓	REINO:	Bacteria
✓	FILO:	Proteobacteria
✓	CLASE:	Gamma proteobacteria
✓	ORDEN:	Enterobacteriales
✓	FAMILIA:	Enterobacteriaceae
✓	GÉNERO:	Escherichia
✓	ESPECIE:	<i>Escherichia coli</i>

Escherichia coli es un componente importante de la microflora intestinal de los seres humanos y mamíferos de sangre caliente. Mientras que *E. coli* coloniza normalmente el tracto intestinal sin causar daño, varios clones de esta especie han desarrollado la capacidad de causar una variedad de enfermedades en el tracto intestinal y otros lugares del huésped (Vidal *et al.*, 2007).

Estas cepas que causan infecciones entéricas se denominan generalmente cepas de *E. coli* diarrogénicas (DEC) o patogénicas y su patogenia se asocia a factores de virulencia a través de plásmidos, transposones, bacteriófagos y/o islas de patogenicidad (Nataro y Kaper, 1998).

El genoma de las DEC es diverso y puede ser mayor que el de las cepas comensales debido principalmente a la adquisición y pérdida de islas de patogenicidad y material accesorio genético. Esto permite una considerable diversidad y plasticidad genética, debido a la pérdida y la ganancia de genes que conlleva a la aparición de un conjunto diverso de patotipos de *E. coli* (Croxen y Finlay, 2010).

La bacteria *E. coli* comparte muchas propiedades con otras enterobacterias. Es un bacilo gramnegativo, tiene una sola cadena espiral de ADN, es anaerobio facultativo; es decir, todos ellos pueden generar energía por respiración aeróbica o anaeróbica (utilizando nitrato, nitrito o fumarato),

no forman esporas y fermentan la glucosa. Todos ellos carecen de citocromo c oxidasa; es decir, son oxidasa negativo (Romero, 2007).

Las *E. coli* pueden sobrevivir en el medio ambiente, siendo la escala de crecimiento óptimo 35-40°C; no obstante, la *E. coli* O157:H7 tiene un intervalo de crecimiento de 7-10°C como temperatura mínima, una máxima de 45-50°C (OMS, 2011) y una óptima de 37°C (ICMSF, 1996). Empero, Ansay *et al.* (1999) informaron que *E. coli* O157:H7 sobrevive la congelación con un cierto descenso en la concentración. Según Pascual (2005) la bacteria sobrevive a -20°C en carne picada congelada, durante más de 9 meses. Por otro lado se han reportado casos como el de Clavero y Beuchat (1995) que recuperaron 5 cepas de *E. coli* O157:H7 a 56.8 °C durante 0, 15 y 30 minutos con disminución de la carga microbiana en las muestras, esto significa que podría sobrevivir a temperaturas por encima de 50°C.

Se ha informado que *E. coli* O157:H7 crece en un rango de pH 4,4 a 9, siendo más resistente al ácido que otros organismos de *E. coli*, esta resistencia aumenta en alimentos ligeramente ácidos; no obstante, también pueden crecer en presencia de un 6% de NaCl. Toleran una Aw mínima de 0,95. Pueden sobrevivir en productos elaborados como, embutidos fermentados, salchichas, salame curado, sidra fresca no pasteurizada, yogurt y queso elaborado con leche cruda (OMS, 2011).

Algunos estudios han puesto de manifiesto que cepas de *E. coli* O157:H7 pueden desarrollar biofilms como resultado de una mayor producción de exopolisacáridos (Ryu *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la formación de biofilm proporciona una mayor resistencia a *E. coli* O157:H7 cuando se expone a soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Ryu y Beuchat, 2005; Wilks *et al.*, 2005).

2.1.2 Características morfológicas y bioquímicas de *E. coli*

2.1.2.1 Características morfológicas

La bacteria *Escherichia coli* tiene una pared celular rígida y porosa para brindar protección y forma, está compuesta por lipopolisacáridos en el exterior, polisacáridos en el interior y pequeños péptidos. Su membrana celular está compuesta por lípidos, proteínas y los flagelos de composición proteica (Romero, 2007).

La cápsula generalmente es de naturaleza polisacárido. Las estructuras capsulares les permite a los microorganismos evitar la fagocitosis por impedir la interacción entre la superficie celular bacteriana y las células fagocíticas (Koneman, 2006). Existen cepas que fabrican unas pequeñas microcápsulas y otras muy pocas elaboran macrocápsulas (Romero, 2007).

Los flagelos son filamentos proteicos, helicoidales, delgados y rígidos, de longitud y diámetro uniforme, responsables de la movilidad de la bacteria. El filamento del flagelo bacteriano está compuesto de subunidades de una proteína denominada flagelina (Prescott *et al.*, 1999).

Las *E. coli* pueden producir: aerobactina, enterotoxinas y toxinas asociadas. La aerobactina permite la captación de hierro desde el medio; esta bacteria necesita el hierro para el transporte de oxígeno y electrones, síntesis de ADN y metabolismo de peróxidos (Blanco y Blanco, 1993). Las enterotoxinas (termolábil y termoestable) afectan exclusivamente la actividad de los enterocitos, las verotoxinas (VT1 y VT2) también pueden lesionar los enterocitos, cuando la verotoxina es absorbida y pasa al torrente circulatorio, dan lugar a lesiones del tejido endotelial en determinadas ubicaciones anatómicas y los factores citotóxicos necrotizantes (CNF1 y CNF2) pueden impedir la división celular (Gyles, 1992; Blanco y Blanco, 1993).

La clasificación de las cepas puede basarse en la diferencia de tres antígenos estructurales: antígeno O, antígeno H y antígeno K. Los antígenos O (somática) se encuentran en la porción del polisacárido LPS que se encuentran en la pared celular. Estos antígenos son estables al calor, pueden

ser compartidos entre diferentes géneros de Enterobacteriaceae y se utilizan comúnmente para describir serológicamente muchos de los bacilos gramnegativos entéricos (Markey *et al.*, 2013).

El antígeno H está asociado con los flagelos, por lo tanto, sólo las enterobacterias flageladas (móviles) como la *E. coli* los presentan. Los flagelos están compuestos por subunidades de proteínas llamadas flagelinas, dependiendo de los tipos de flagelina son formados los diferentes determinantes antigénicos. El antígeno K se encuentra dentro de las cápsulas, que es el componente estructural más externo de la célula bacteriana. Los diversos tipos de hidratos de carbono, junto con los tipos de enlaces entre los azúcares, forman los determinantes antigénicos que definen a los antígenos capsulares (Vadillo *et al.*, 2002).

El antígeno F está relacionado a las fimbrias o pilis, las cuales sirven para la adhesión de superficies mucosas. Las fimbrias son filamentos proteicos que parten de la superficie de la bacteria. Pueden ser estructuras fímbricas rígidas (de 5 a 7 nm diámetro) o flexibles (de 2 a 3 nm) que están constituidas por 1000 subunidades estructurales repetidas y unas pocas subunidades menores funcionales entre las que se encuentran las responsables de la adhesión (Vadillo *et al.*, 2002). En *E. coli* la mayoría de estructuras adherentes son fimbrias proteicas que se unen a receptores específicos situados en las membranas de las células epiteliales. Los diferentes tipos de adhesinas fimbriales comparten una estructura general similar, en forma de filamentos heteropoliméricos constituidos por subunidades proteicas que conforman el cuerpo de la fimbria (Connell *et al.*, 1996).

Entre las especies de *E. coli*, hay muchos antígenos serológicamente distintos y los serotipos específicos están asociados con enfermedades particulares. Como por ejemplo: *E. coli* O157:H7 que causa una forma grave de colitis hemorrágica.

La secreción de proteínas en gramnegativos, como la *E. coli* consiste en que las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna (MI) y la membrana externa (ME) que es una bicapa asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos (Lee y Schneewind, 2001).

Las vías de secreción han sido clasificadas en cinco grupos principales: secreción tipo I, II, III, IV y los autotransportadores, se basan en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan. Sin embargo, estos grupos se pueden aún subdividir en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte a través de la membrana plasmática (Lee y Schneewind, 2001). Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal y las Sec-independientes en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (Koster *et al.*, 2000; Thanassi y Hultgren, 2000).

2.1.2.2 Características bioquímicas

Las características bioquímicas de la *E. coli* se han aprovechado para su aislamiento e identificación en el laboratorio. Una de las principales características de *E. coli* es su capacidad para fermentar azúcares. Es oxidasa negativa, fermentadora de glucosa, lactosa y sacarosa, positiva al indol (99%), descarboxilasa de la lisina, fermentación de manitol y gas a partir de glucosa, su pH óptimo es de 6.0-7.0. El 90% de *E. coli* son fermentadoras de lactosa positiva, pero existen algunas cepas patógenas, incluyendo ciertas *E. coli* enteroinvasivas que son lactosa negativas (Fotadar *et al.*, 2005).

La bacteria *Escherichia coli* crece en agar MacConkey. Las colonias que fermentan lactosa y el medio que los rodea tornan un color rosa debido a la producción de ácido a partir de la lactosa. Las sales biliares y el colorante cristal violeta inhiben las grampositivas permitiendo el crecimiento de enterobacterias gramnegativas. Si el organismo no es capaz de usar la lactosa entonces éste ataca la peptona (fuente de nitrógeno) en el medio, resultando productos metabólicos alcalinos, el medio y las colonias aparecen coloreadas de un color palo rosa (lactosa negativa) (Markey *et al.*, 2013). Existe otro medio muy usado para el aislamiento de *E. coli* O157:H7, el agar MacConkey sorbitol, en éste la mayoría de las cepas hemorrágicas de *E. coli* no fermentan el sorbitol y producen colonias incoloras (Meng *et al.*, 2001).

Las características bioquímicas del *E. coli* han permitido identificarlas mediante diferentes pruebas bioquímicas que a continuación se señalan:

a) Agar hierro tres azúcares (TSI)

Interpretación: Las reacciones que pueden observarse son:

- Pico alcalino (rojo) / fondo alcalino (rojo). No hay fermentación de azúcares.
- Pico alcalino (rojo) / fondo ácido (amarillo). Glucosa fermentada. Lactosa y sacarosa no fermentadas.
- Pico ácido (amarillo) / fondo ácido (amarillo). Glucosa fermentada. Lactosa y/o sacarosa fermentadas.

Escherichia coli O157:H7 rápidamente fermenta la lactosa y es indistinguible de la mayoría de otros *E. coli* en un medio que contiene lactosa. Sin embargo, a diferencia de otros *E. coli*, aproximadamente el 80% de *E. coli* O157: H7, no fermenta D-sorbitol en 24 h a 37 °C (Feng, 2000). El fracaso para fermentar D-sorbitol es relativamente raro entre otras cepas de *E. coli* y es extremadamente útil en la diferenciación de *E. coli* O157: H7 (Feng, 2000). Las cepas de *E. coli* de serotipo no H7 que no son patógenas y no fermentan el sorbitol, de vez en cuando se han aislado de los alimentos (Alexandre *et al.*, 2000).

b) Utilización de Citrato

Interpretación:

- Prueba positiva: desarrollo de color azul
- Prueba negativa: el medio conserva el color verde original y no hay desarrollo bacteriano.

Escherichia coli son citrato negativo y cuando crece en agar citrato no cambia el color del medio (WHO, 2007).

c) Sulfuro, indol, movilidad (SIM)

Interpretación:

- Sulfuro de hidrógeno: Es positiva cuando se ennegrece el medio.
- Indol: Es positiva cuando se produce un color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el medio.
- Movilidad: Es positiva cuando se visualiza turbidez parcial o total del medio y negativa cuando hay crecimiento bacteriano solamente en la línea de siembra.

Organismos altamente móviles muestran un crecimiento a lo largo del tubo. El crecimiento de organismos no móviles sólo se produce a lo largo de la línea de punzada. *Escherichia coli* y más específicamente, el serotipo O157:H7 son altamente móviles y muestra turbidez en todo el tubo. Esto es debido a la posesión de antígenos de la motilidad (Ware *et al.*, 2000).

d) Lisina, Hierro, Agar (LIA)

Interpretación:

- Descarboxilación de la lisina: Prueba positiva: pico violeta / fondo violeta, Prueba negativa: pico violeta / fondo amarillo
- Desaminación de la lisina: Prueba positiva: pico pardo rojizo / fondo amarillo
- Sulfuro de hidrógeno: Prueba positiva: Se observa ennegrecimiento del medio.

Escherichia coli descarboxila la lisina y el medio torna un color violeta (Ware *et al.*, 2000).

e) Voges-Proskauer-rojo de metilo (VP-RM)

Escherichia coli (incluyendo *E. coli* O157: H7) han sido demostrado RM positivo, pero VP negativo (Ware *et al.*, 2000).

2.1.3 Serotipos de *E. coli*

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K) (Nataro y Kaper, 1998).

El antígeno O es un polisacárido termoestable y es responsable del serogrupo; la presencia de antígenos K se determinó originalmente por medio de pruebas de aglutinación bacteriana: una cepa de *E. coli* que era inaglutinable por antisuero O se convirtió en aglutinable cuando se calentó el cultivo entonces se consideró un antígeno K. Los antígenos fimbriales proteicos se han eliminado de la serie K y se les ha dado las designaciones F (Vadillo *et al.*, 2002).

Una combinación específica de los antígenos O y H define el "serotipo" de un aislamiento. *E. coli* de serogrupos específicos puede estar asociada de forma reproducible con ciertos síndromes clínicos, pero no es en general que los antígenos serológicos confieren virulencia a sí mismos (Nataro y Kaper, 1998).

La serotipificación es una base importante para la diferenciación de cepas de STEC y es a menudo el punto de partida en la caracterización de este patotipo. Debido a la importancia del serotipo O157:H7 en la enfermedad humana, es común considerar los serotipos de STEC en 2 categorías principales, O157 y no O157 (Gyles, 2007).

La clasificación de STEC se da en 5 seropatotipos, desde el seropatotipo A al seropatotipo E, basados en la asociación de los serotipos con enfermedad de gravedad variable en los seres humanos y con la enfermedad esporádica o brotes (Karmali *et al.*, 2003).

El seropatotipo A se compone de los serotipos que se consideran más virulentos, como O157:H7 y O157: NM (NM: no móvil, carece de antígeno H). El seropatotipo B se compone de los serotipos O26: H11, O103: H2, O111: NM, O121:H19 y O145: NM, causantes de enfermedad grave y brotes, pero con menor frecuencia que el serotipo O157. El seropatotipo C está compuesto por los serotipos que con frecuencia son implicados con casos esporádicos de SUH pero no asociados con

brotos e incluyen los serotipos O91:H21 y O113:H21 (Karmali *et al.*, 2003). Los seropatotipos D y E se componen de numerosos serotipos que han sido implicados en casos esporádicos de diarrea y serotipos que no han sido implicados en la enfermedad en los seres humanos, respectivamente. Los autores concluyen que el concepto de seropatotipo es útil para la investigación de los factores bacterianos que contribuyen a la enfermedad y a la transmisibilidad que puede ser perfeccionado para su uso en el diagnóstico (Karmali *et al.*, 2003).

No obstante, la clasificación serológica tiene una limitada sensibilidad y especificidad, además de ser un procedimiento tedioso, caro y solamente realizado por un pequeño número de laboratorios de referencia. Actualmente la clasificación de las cepas de *E. coli* patógenas se realiza mediante la detección de los genes que codifican los principales y característicos factores de virulencia de cada grupo. Esta es la prueba de mayor utilidad y se puede utilizar en conjunto con ensayos fenotípicos, pero sólo la pueden utilizar los laboratorios que desarrollan pruebas moleculares (Rodríguez-Ángeles, 2002).

2.1.4 Patotipos de *E. coli*

La diarrea continúa siendo un importante problema de salud en el mundo, especialmente en los países en vías de desarrollo (Boschi *et al.*, 2008). Las cepas *E. coli* diarrogénicas (DEC) como grupo, son responsables del 30-40% de diarrea aguda en niños y son reconocidas como patógenos importantes, según la Organización Mundial de la Salud (Xiaodong *et al.*, 2010).

La patogénesis de las DEC, está asociada a un número de características de virulencia que varían de acuerdo a los patotipos (Xiaodong *et al.*, 2010). Actualmente este grupo tiene diferentes mecanismos de patogenicidad, de acuerdo a estas características se clasifican seis patotipos o patovariedades, que son taxones con un rango jerárquico inferior a la subespecie. Según esto se clasifican en (Rodríguez-Ángeles, 2002):

- *Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP)
- *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET)
- *Escherichia coli* Enteroinvasiva (ECEI)

- *Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA)
- *Escherichia coli* Entero difusa adherente (ECDA)
- *E. coli* productora de shigatoxinas (STEC) O *E. coli* productora de Verotoxinas (VTEC), que posee un subtipo muy patógeno para el hombre: *Escherichia coli* Enterohemorrágica (ECEH).

Cada patotipo tiene factores de virulencia específicos que son usados para la identificación y clasificación, así como serotipos específicos. A pesar de ello, con la excepción de STEC (especialmente *E. coli* O157:H7), las DEC no son diagnosticadas rutinariamente en los laboratorios clínicos (Nataro y Kaper, 1998).

Como la mayoría de los patógenos de la mucosa, las DEC pueden seguir una estrategia necesaria de infección: i) Colonización de un sitio de la mucosa, ii) Evasión de las defensas del huésped, iii) La multiplicación y iv) El daño al hospedador.

La característica más altamente conservada de las cepas DEC es su capacidad para colonizar la superficie de la mucosa intestinal a pesar de la peristalsis y la competencia por los nutrientes de la flora natural del intestino (incluyendo otras cepas de *E. coli*). La presencia de la adherencia superficial de fimbrias es una propiedad de prácticamente todas las cepas de *E. coli*, incluyendo las variedades no patógenas. Tres paradigmas generales han sido descritos por *E. coli* que pueden causar diarrea: (i) la producción de enterotoxina (ETEC y EAEC), (ii) la invasión (EIEC) y / o (iii) la adherencia íntima con la señalización de la membrana (EPEC y EHEC) (Nataro y Kaper, 1998).

2.1.4.1 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET)

La ECET es uno de los patotipos más estudiados, asociado con morbilidad en niños menores a 5 años y en los adultos, puede ser asintomática (Rodríguez-Ángeles, 2002). Las ECET son una causa importante de diarrea en los bebés y en los viajeros de países subdesarrollados. La enfermedad varía de un leve malestar a un síndrome grave similar al cólera. Las cepas de ECET tienen adhesinas en forma de fimbrias, que ayudan a que se adhieran a receptores específicos en los enterocitos del

intestino delgado proximal. Estas cepas causan diarrea mediante la acción de las enterotoxinas; las termoestables (ST) y las termolábiles (LT) (Smith y Gyles, 1970).

2.1.4.2 *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP)

EPEC fue el primer grupo de cepas de *E. coli* reconocido como patógeno y en 1955 fue utilizado por primera vez para describir aislamientos de *E. coli* vinculados a diarrea infantil. Han sido documentados como causas importantes de diarrea del viajero en México y África. Las EPEC típicas presentan bfp y las EPEC atípicas no lo presentan (Vidal *et al.*, 2007).

2.1.4.3 *Escherichia coli* enteroagregativa (ECEA)

ECEA tiene la capacidad de incrementar la mucosa y secreción del moco, se adhieren al epitelio intestinal por unas fimbrias de adherencia agregativa (AAFs en inglés aggregative adherence fimbriae) produciendo inflamación y daño de la mucosa (Nataro y Kaper, 1998). Estas cepas se asocian con diarrea persistente en niños pequeños. Se asemejan a las cepas *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) en que se adhieren a la mucosa intestinal, causan diarrea sin sangre sin invadir o causar inflamación. Producen una toxina codificada por plásmidos lábiles al calor llamado Toxina enteroagregativa ST (EAST) (Kaper y Nataro, 1998).

2.1.4.4 *Escherichia coli* entero difusa adherente (ECDA)

La ECDA corresponde a un grupo heterogéneo de microorganismos con virulencia variable; se identifica por su adherencia a células Hep-2 en un patrón difuso; posee una fimbria F1845 que participa en el fenómeno de adherencia difusa; los genes que la codifican pueden estar en el cromosoma o en un plásmido. Las cepas ECDA inducen un efecto citopático, se debe a un desarrollo de la extensión celular que está junto a la adherencia de la bacteria (Rodríguez-Ángeles, 2002).

2.1.4.5 *Escherichia coli* enteroinvasiva (ECEI)

Este grupo de *E. coli* está relacionado genéticamente con la bacteria *Shigella* spp. en sus mecanismos patogénicos y el tipo de enfermedad clínica que causan, éstas carecen aparentemente de adhesinas fimbriales; Sin embargo, las EIEC tienen unas adhesinas específicas que se cree que son

proteínas de membrana externa y a su vez son invasivas como *Shigella* spp., además no producen LT, ST ni las Shiga toxinas (Nataro y Kaper, 1998). El síndrome clínico es idéntica a la de *Shigella dysenteriae* presentan colitis inflamatoria, diarrea acuosa y disentería; acompañado de fiebre (Donnenberg y Whittam, 2001; Rodríguez-Ángeles, 2002).

2.2 *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC)

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) fue descrito por primera vez por Knowalchuk en 1977, quien informó que cepas de *E. coli* de los serogrupos O18, O26, O111 y O128 aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón producían una toxina a la que se denominó Verotoxina (VT) debido al efecto citotóxico en células Vero. Las cepas capaces de producir VT se les denominó *E. coli* verotoxigenicas (VTEC). Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo cual se las llamó “*Shiga - like toxin*” (SLT, Shiga toxinas) y a las *E. coli* productoras se las denominó productoras de toxinas tipo shiga (SLTE) (O’Brien *et al.*, 1982). Posteriormente se les designó el nombre de *E. coli* productoras de toxinas shiga (STEC) (Calderwood *et al.*, 1996).

Las *E. coli* productoras de toxinas shiga, consta de cepas de *E. coli* que producen una o más toxinas de la familia Stx. La familia incluye Stx1, estrechamente relacionada con el propio Stx, y Stx2, que es aproximadamente 57% homóloga a Stx1, tanto a nivel de nucleótidos y aminoácidos (Gyles, 2007).

Las Stx1 y/o Stx2, son el principal mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 junto con otros factores de virulencia. Sin embargo, otros 200 serotipos de STEC no O157 también han sido identificados como productores de estas toxinas, en forma conjunta o separada (Stx1 y/o Stx2) y han estado involucrados en enfermedades diarreicas de humanos e incluso en cuadros de síndrome urémico hemolítico (Villalobos *et al.*, 2008).

Las cepas *E. coli* de serotipo O157:H7 y los no móviles (NM) variante de *E. coli* O157: NM, están siendo los más comunes en muchas partes del mundo. Cepas *E. coli* O157 con otros antígenos H no son conocidos como causantes de infecciones en los seres humanos. Los más comunes serotipos STEC no O157:H7 asociados con la enfermedad humana son O26:H11, O103:H2, O111: NM, y O113:H21; se caracterizan por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica (Johnson *et al.*, 1996).

2.2.1 Shigatoxinas

Las toxinas Shiga (Stx) son un factor de virulencia crítico en las enfermedades por STEC (Gyles, 2007). Han sido asociadas a una variedad de enfermedades humanas incluyendo a una diarrea leve, colitis hemorrágica y la forma diarrea asociada (D+) del síndrome hemolítico urémico (SHU) (Griffin y Tauxe, 1991). Los numerosos serotipos STEC identificados O157:H7 y O157: H- (no móvil o NM) continúa siendo la causa dominante de enfermedades en los humanos. Las toxinas Stx1 y Stx2 son la causa del daño endotelial vascular observado en la colitis hemorrágica y en los pacientes con SHU. El serotipo O157:H7 ha sido mayormente aislado de pacientes con colitis hemorrágica (CH) y de la forma diarrea asociada (D+) del SHU (Karmali, 1989).

Poseen estructura heterohexámero A₁B₅ de aproximadamente 70 kDa con subunidades A-B y están codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 KDa) es la parte biológicamente activa y la B (7,5 KDa), presente en cinco copias, es la que se une al receptor celular específico globotriaosilceramida (Gb3) (Calderwood *et al.*, 1996).

La subunidad A consiste en un fragmento A1 (27,5 kDa) que contiene el sitio enzimático y un fragmento A2 (7,5 kDa) que están vinculados a través de un enlace de sulfuro (O'Brien *et al.*, 1982). A pesar de que poseen el mismo mecanismo de acción, sólo hay 55% de identidad en la secuencia de aminoácidos entre las subunidades A de Stx1 y Stx2 (Gyles, 2007). Posee actividad enzimática que permite a la toxina escindir una base específica de la adenina del ARNr 28 S y de ese modo prevenir la síntesis de proteínas. La apoptosis celular se puede dar como resultado al estrés ribocitotóxico

producido por la inhibición de la síntesis de la proteína o se puede desarrollar rápidamente debido a la señalización de la toxina (Gyles, 2007).

El desarrollo de la muerte celular programada en respuesta a Stx puede variar con el tipo de célula (Cherla *et al.*, 2003). El grupo de subunidades B se une a los receptores de glicolípidos específicos en la superficie de las células, lo que permite la internalización de la molécula de la toxina. Las toxinas Stx se unen a globotriaosilceramida (Gb3). El Stx (Stx2e) implicado en el edema enfermedad de los cerdos, utiliza globotetraosilceramida (Gb4) como su receptor preferido, pero también se puede unir Gb3 (Rocha *et al.*, 2005).

Las shigatoxinas se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2, según la neutralización del efecto citotóxico en células Vero o HeLa con anticuerpos específicos, o por la detección de los genes Stx mediante técnicas de biología molecular (Paton y Paton, 1998).

2.2.1.1 Shigatoxina 1

La molécula de Stx1 es una estructura altamente idéntica a la de Shiga toxina de *S. dysenteriae* de tipo 1 diferenciándose únicamente por un solo aminoácido (Strockbine *et al.*, 1988). Hasta el presente sólo se ha identificado la variante Stx1c asociada fundamentalmente al reservorio ovino (Zhang *et al.*, 2002). Stx1c también se detectó en combinación con Stx2d en aislamientos de origen clínico de casos menos severos de diarrea. En Argentina, se aislaron cepas portadoras de stx1c y stx2d en muestras fecales de rumiantes silvestres cautivos (Leotta *et al.*, 2004).

2.2.1.2 Shigatoxina 2

Hay varias variantes antigénicas de Stx2, llamado Stx2c, Stx2d, Stx2d activable, Stx2e, y stx2f, que difieren en su actividad biológica y la asociación con la enfermedad. Se han reportado otras variantes de Stx, pero no hay información sobre su significado clínico). También se determina que Stx2d y Stx2e se asocia con enfermedad leve o asintomática que fueron producidos por cepas *eaeA* negativo y nunca estuvieron presentes en 268 STEC aisladas de pacientes con SUH. El Stx2c se

encontró de manera similar a frecuencias bajas (aproximadamente 5%) en los aislados de pacientes con SHU y de pacientes con diarrea (Friedrich *et al.*, 2003).

Hay evidencia de una asociación de Stx2 con un mayor riesgo de desarrollar SUH y la presencia de ambos *eaeA* y *stx2* en un aislado STEC se considera que es un factor predictivo de SUH (Boerlin *et al.*, 1999; Ethelberg *et al.*, 2004). No se sabe si la asociación de Stx2 con SUH es el resultado de la acción de Stx2 o si Stx2 es simplemente un marcador de una mayor gravedad de la enfermedad. Sin embargo, Stx2 es de aproximadamente 1000 veces más tóxico para las células endoteliales microvasculares renales de los humanos que la Stx1 (Paton y Paton, 2000). Además, el soporte experimental para la asociación entre Stx2 y la enfermedad severa fue proporcionado por Siegler *et al.* (1994), que compararon los efectos de Stx1 y Stx2 en un modelo animal primate con SUH. La administración intravenosa de Stx2 resultó en SUH característica clínica y desarrollos patológicos, mientras que la administración de Stx1 no indujo una evolución similar.

2.2.2 Patogénesis

Se trata de una bacteria que forma su propio receptor y lo inocula en la célula blanca. Esta estrecha unión de la bacteria con el enterocito estimula una serie de transducción de señales que se traducen en una reorganización del citoesqueleto de la célula del epitelio intestinal, lo que se expresa con la formación de un pedestal que "acoge" a la bacteria (Nataro y Kaper, 1998).

Una vez que la STEC logra colonizar el intestino, secreta las Stxs. A través de la subunidad B, se establece la unión de la Stx con el receptor glicolípidico Gb3 presente en la superficie epitelial; esto permite la entrada de la subunidad A al citoplasma celular mediante endocitosis, subunidad que finalmente interfiere con la función ribosomal, la Stx dentro de la vesícula es transportada al aparato de Golgi y al retículo endoplásmico, provocando una alteración letal en la síntesis de proteínas y muerte de las células blanco por apoptosis (Nataro y Kaper, 1998; Sandvig *et al.*, 2002; WHO, 2007).

En etapas sucesivas, la Stx es traslocada al torrente sanguíneo y transportado por los neutrófilos a los diferentes tejidos donde existen receptores Gb3: enterocitos, células endoteliales del glomérulo renal, membrana celular de los eritrocitos y células cerebrales, entre otras (Proulx *et al.*,

2001). Las citosinas pro-inflamatorias IL-1 β y factor de necrosis tumoral- α también puede regular positivamente la expresión de Gb3 en las células endoteliales (Palermo *et al.*, 1999).

La mayoría de los aspectos de diarrea sanguinolenta y SHU parecen ser atribuibles a la acción de Stx en las células endoteliales vasculares y la microangiopatía trombótica es una característica central de la enfermedad (Ray y Liu, 2001). Esto es evidente en las lesiones y sintomatología de las enfermedades STEC asociados en animales y humanos. La diarrea con sangre está asociada a lesiones en los vasos sanguíneos pequeños en el colon (WHO, 2007).

El SHU se asocia con lesiones glomerulares renales que dañan a las células endoteliales, que se hinchan y se desprenden de la membrana basal. Simultáneamente se produce un depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, se oclucionan los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, provocando insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos. El daño al epitelio glomerular y tubular proximal también pueden contribuir al daño renal. También se observan lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas (WHO, 2007).

La respuesta inflamatoria se extiende más allá del intestino y en los pacientes con SUH se ha demostrado que han elevado los niveles urinarios de IL-8 y de los monocitos quimioatrayentes. Guessous *et al.* (2005) informó que la exposición de las células endoteliales microvasculares humanas a Stx2 y LPS resultó en la liberación de quimiocinas incluyendo IL-8 y otros factores.

2.2.3 *E.coli* enterohemorrágica (ECEH) y el serotipo O157:H7

ECEH serotipo O157:H7 fue reconocida por primera vez en 1982 como un patógeno humano asociado con brotes de diarrea sanguinolenta en Oregón y Michigan en EEUU (Riley *et al.*, 1983; Wells *et al.*, 1983). En 1983 se publicaron dos estudios epidemiológicos que relacionaban la infección STEC con dos enfermedades; la colitis hemorrágica (CH) y SUH. Los brotes CH se caracterizan por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre. Por otro lado, el SUH es caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica (Rodríguez- Ángeles, 2002).

El término *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) ha sido usado para designar un subtipo de STEC, que es considerado el mayor patógeno que afecta al ser humano. ECEH y otros STEC, son patógenos importantes transmitidos por los alimentos asociados con enfermedades gastrointestinales severas y sistémicas (CH y SHU) causantes importantes de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad, y mortalidad en adultos. En los ancianos, la tasa de letalidad por el SUH puede elevarse al 50% (Karmali, 1989).

Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC:

- Factores de patogenicidad: i) cepas típicas cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E, y ii) cepas atípicas, cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa.
- Función del serotipo: i) cepas *E. coli* O157:H7, Este serotipo no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucoronidasa; esta bacteria puede producir principalmente SUH y (CH) y ii) cepas no-O157:H7, cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7.

El principal mecanismo de patogenicidad de las cepas EHEC no-O157:H7 es la toxina Stx, el fenómeno de A/E y la presencia de pO157. Estas cepas pueden ser sorbitol positivo, y sus serotipos son diferentes del O157:H7. El cuadro clínico causado por las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica. Las cepas no-O157 son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación, aunque se sabe que se pueden aislar de los mismos alimentos que las cepas de serotipo O157:H7 (Rodríguez-Ángeles, 2002).

ECEH se consideran "moderadamente invasivo", aunque no se sabe nada acerca de sus antígenos de colonización; Sin embargo, se presumen que las fimbrias están involucradas.

Aunque se han identificado más de 200 serotipos de STEC, EHEC O157:H7 está implicado en la gran mayoría de los brotes y casos esporádicos de diarrea con sangre en América del Norte (Wells *et al.*, 1983). Se considera que las cepas de EHEC son un subconjunto de STEC, que además de producir shigatoxinas poseen el gen *hlyA* y el gen *eaeA*, que codifican la enterohemolisina y la

intimina respectivamente, y que además, son capaces de causar enfermedades graves en el humano (Riley *et al.*, 1983).

2.2.3.1 Patogenicidad

En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes STX1 y STX2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o ambas. Además de las toxinas, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gene cromosomal *eaeA* que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos (*eaeA* también se encuentra en EPEC). Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina (Rodríguez-Ángeles, 2002).

a) Región LEE (del inglés, locus of enterocyte effacement) y lesión A/E

En la misma se encuentra el gen *eaeA*, el cual codifica una proteína denominada intimina responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y de la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E (del inglés, **att**aching and **eff**acing). Se sabe que la presencia del LEE está fuertemente asociada con la enfermedad; sin embargo, otros serotipos de STEC también poseen el LEE (Lim *et al.*, 2010).

La región LEE codifica además reguladores transcripcionales, chaperonas, el sistema de secreción de tipo III (SSTIII) empleado en el transporte de las proteínas efectoras hacia la célula huésped, translocadores, y proteínas efectoras incluyendo al receptor translocado de la intimina denominado Tir (del inglés, translocated intimin receptor). Se considera que ciertos serotipos de STEC-LEE positivos (O157:H7, O26:H11, O111: NM y O145: NM) son altamente virulentos y están asociados a brotes y casos esporádicos de enfermedad severa en humanos. Sin embargo, la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis, dado que un gran número de cepas STEC-LEE negativas son capaces de causar enfermedad severa y ocasionalmente brotes (Paton y Paton, 1998).

b) Intimina

La intimina $\gamma 1$ de EHEC O157:H7 tiene un 83% de identidad con la intimina de EPEC. Estudios *in vivo* en lechones convencionales y genobióticos, han demostrado que la intimina es el único factor de adherencia potencial de EHEC O157:H7 que desempeña un papel en la colonización intestinal (Nataro y Kaper, 1998). Además, se sabe que existe una fuerte asociación entre la presencia del gen *eaeA* y la capacidad de EHEC para causar enfermedad grave en humanos, tales como CH y SUH. No obstante, la intimina no es esencial ya que se han detectado cepas negativas a *eaeA* causantes de SUH y CH (Paton y Paton, 1998; Gyles, 2007).

La presencia de *eaeA* en cepas de EHEC de animales esta comúnmente asociada a los serotipos frecuentemente relacionados a la enfermedad en los humanos, como lo son los serotipos O157, O26, O111, entre otros. Sin embargo, las cepas aisladas de los casos de SUH se adhieren en un mayor grado que las de animales (Paton y Paton, 1998; Gyles, 2007).

El gen *eaeA* es el responsable de la existencia de varios tipos y subtipos de intimina; se une al receptor Tir en la célula epitelial, cuyo gen presenta también polimorfismo, y está asociada a los diferentes patrones de colonización en el intestino. Tir (translocador del receptor de intimina) es una proteína de membrana de 90 kDa expuesta en la superficie de las células epiteliales que cumple la función de receptor de la intimina en las células epiteliales (Nataro y Kaper, 1998).

Varios estudios sugieren que la intimina de EHEC O157:H7 antes de unirse a la Tir se une a algunas estructuras expresadas en la superficie celular del huésped, como las integrinas β -1 y la nucleolina. Además, se ha reportado que la nucleolina y la integrina β -1 se encuentran en estrecha relación con la adherencia de EHEC O157:H7 en los porcinos y terneros infectados y que existe una competencia entre la nucleolina y Tir (Gyles, 2007).

c) Plásmido pO157

Casi todos los aislados EHEC O157:H7 albergan un plásmido de virulencia de 60 megadaltones (MDa) llamado pO157, que codifica varios factores de virulencia (Croxen y Finlay, 2010). Contiene algunos genes que codifican para los factores de virulencia de *espP* (una serina

proteasa), *katP* (catalasa peroxidasa), *hlyA* (enterohemolisina), *etp* (un sistema de secreción de tipo II) (Rivas *et al.*, 2006). Además de una adhesina putativa ToxB, una metaloproteasa de zinc (*stcE*) y un fragmento conservado de *eaeA* (Lim *et al.*, 2010).

La presencia del plásmido pO157 se correlaciona con la expresión de fimbrias involucrado en la adherencia de STEC O157 (Karch *et al.*, 1987). Sin embargo, a partir de estudios posteriores con cultivos celulares se concluyó que no hay consistentes pruebas de un papel del pO157 en la adherencia. Además, la mayoría de los estudios en animales han encontrado que la presencia o ausencia del plásmido no tienen efecto sobre la capacidad de las cepas de STEC para colonizar el epitelio intestinal o para causar lesiones A/E (Wadolowski *et al.*, 1990).

d) Enterohemolisina

La enterohemolisina fue el primer factor de virulencia de pO157 descrito y se encuentra en casi todas las cepas de EHEC O157:H7. Está ampliamente distribuida entre las cepas STEC no O157, como O111:H8, O8:H19 y cepas de STEC positivas y negativas a *eaeA*, pero no se sabe si estos tienen idénticas actividades biológicas (Nataro y Kaper, 1998; Gyles, 2007; Lim *et al.*, 2010).

La enterohemolisina puede contribuir a la enfermedad a través de la lisis de los eritrocitos liberando el grupo hemo y la hemoglobina como una fuente potencial de hierro para las bacterias, aumentando el crecimiento de STEC O157 en el intestino. También podría contribuir por su efecto dañino de la membrana en una amplia variedad de tipos de células y su capacidad para inducir la producción de citoquinas pro-inflamatoria (Taneike *et al.*, 2000).

e) Otros factores de virulencia

Es difícil determinar si son realmente factores de virulencia, ya que no existe un buen modelo animal que imite realmente su rol en la enfermedad. El papel potencial de los LPS en la adherencia también ha sido examinado, un par de estudios han examinado el papel de las cadenas laterales del antígeno O del LPS en la adherencia de cepas de EHEC O157:H7. En estos estudios se determinó que el LPS no estaba involucrado en la adhesión a las células epiteliales *in vitro* (Nataro y Kaper, 1998, Paton y Paton, 1998).

Miyamoto *et al.* (2006) reportaron una activación de citoquinas pro-inflamatorias y la atracción de los neutrófilos subepiteliales después de la adición de la flagelina H7 al lumen de xenoinjertos de colon humano. La flagelina H7 se une a los receptores tipo toll, que conduce a la activación de NF-kappaB y a la secreción de IL-8. Cumple un rol importante en la inflamación que desarrolla, probablemente impide la función de barrera del epitelio intestinal, facilitando de ese modo el paso de Stx desde el lumen hacia el área de la submucosa (Hurley *et al.*, 2001).

También se ha descrito una proteína de membrana externa de 69 kDa codificada por el gen *chuA*, presente en EHEC O157:H7 pero no en otras cepas STEC, que se sintetiza en respuesta a la limitación de hierro y que permite la utilización del grupo hemo o hemoglobina como fuente de hierro, necesarios para el crecimiento de EHEC O157:H7 (Nataro y Kaper, 1998).

2.3 Epidemiología

2.3.1 Reservorios de STEC O157:H7

Los rumiantes domésticos y salvajes; en particular, el ganado, se considera el principal reservorio natural de STEC. La carne de vacuno es considerado como la principal fuente de contaminación de los alimentos, siendo la carne picada mal cocida y la leche cruda los principales vehículos para la transmisión de *E. coli* O157: H7 en brotes de origen alimentario (Blanco *et al.*, 2004; Duffy *et al.*, 2006).

Se puede encontrar en bovinos, ovejas, cabras, caballos, guanacos (Mercado *et al.*, 2004; Gyles, 2007) y con menos frecuencia en cerdos (Gyles, 2007), pollos y gaviotas (Nataro y Kaper, 1998), pavos (Lim *et al.*, 2010), gatos y perros (Bentancor *et al.*, 2006).

Entre el 1% y el 50% del ganado sano, transporta y elimina *E. coli* O157: H7 en sus heces en un momento dado (Elder *et al.*, 2000; Xiaodong *et al.*, 2010). Más de 435 serotipos de STEC se han recuperado de bovinos y más de 470 serotipos se han registrado en los seres humanos (Beutin *et al.*, 2004), la mayoría de estos últimos se han identificado también en el ganado bovino, carne de res o

ambos. En Norteamérica, el ganado vacuno es de mayor importancia como reservorio de STEC, pero en países como Australia, las ovejas son de mayor importancia (Gyles, 2007).

Se han realizado numerosos estudios sobre la prevalencia de STEC que permitieron confirmar al ganado vacuno como principal reservorio (Wells *et al.*, 1991; Chapman *et al.*, 1993; Beutin *et al.*, 2004). El sitio predominante del tracto gastrointestinal para la colonización de *E. coli* O157 es el recto terminal (WHO, 2007; Lim *et al.*, 2010) por lo tanto, también es excretada en las heces, oscilando las tasas de excreción entre el 5,8% y el 70% (Elder *et al.*, 2000).

Tanto el ganado de carne como el ganado lechero son portadores de *E. coli* O157:H7. La bacteria no es patógena para el ganado, la colonización es de menos de 2 meses de duración y la portación fecal es más frecuente en el ganado joven (2 a 24 meses) que en el ganado adulto; Sin embargo, se demostró que la excreción de STEC no-O157 en ganado bovino adulto y en terneros es de 21% y 50%, respectivamente. A partir de las heces de bovinos sanos también se han aislado diferentes serotipos de STEC e inclusive se demostró que un animal puede portar más de un serotipo (WHO, 2007).

Los animales engordados en sistemas de cría intensiva tienen una prevalencia de STEC tres veces superior a la observada en animales alimentados por meses con granos, probablemente debido a alteraciones de la flora normal, el pH y la concentración de ácidos grasos. La capacidad de colonización de *E. coli* O157:H7 en el ganado está influenciada por la dosis infectiva y por la susceptibilidad de los animales (WHO, 2007).

Los serotipos O5: H-, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O111:H11, O111: H- y O118:H16 entre otros, son los más comúnmente aislados en el ganado bovino. En Chile se demostró que el 34,5% del ganado faenado era portador de STEC y en la Argentina, la frecuencia de detección en ganado bovino fue del 35% para STEC no O157 y 0,5% para STEC O157:H7 (Chinen *et al.*, 2003; Meichtri *et al.*, 2004).

Hussein y Bollinger (2005) reportaron tasas de prevalencia de STEC O157 de 0,3 a 19,7% en animales de engorde y de 0,7 a 27,3% en animales en pastoreo, comparadas con las correspondientes

tasas de prevalencia de STEC no O157 que eran de 4,6 a 55,9% y 4,7 a 44,8%, respectivamente, demostrando que las tasas de aislamiento del serotipo O157 son mucho menores que las de los serotipos no O157. La eliminación de STEC en las heces puede ser transitoria y está influenciada por una serie de factores como la raza, el destete, la edad, la dieta, el estrés, la densidad de población, la región geográfica y la estación (Paton y Paton, 2000; Gyles, 2007).

Las tasas de eliminación de STEC O157:H7 y de otros serotipos de STEC son bajas en los terneros antes del destete, con tasas más altas en los terneros en la fase pos destete y tasas intermedias en animales adultos. Estudios realizados en Europa han demostrado que STEC se excreta a mayor frecuencia en los meses más cálidos y con una frecuencia menor durante los meses fríos (Gyles, 2007).

No parece haber ninguna diferencia en las tasas de prevalencia o concentraciones fecales de STEC O157:H7 que se desprenden por el ganado en los pastos y el ganado en corrales de engorde. Algunos ganados eliminan STEC O157:H7 a alta concentración fecal durante varias semanas y se les llama excretores persistentes (Naylor *et al.*, 2003).

2.3.2 Fuentes de transmisión de STEC O157:H7

Hay una compleja interacción de factores ambientales y de comportamiento de los animales y los seres humanos, que facilitan la propagación de *E. coli* O157:H7. La principal vía de transmisión de STEC son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, alfalfa, brotes de soja y rábanos, jugos de manzana no pasteurizados (WHO, 2007). La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces del ganado bovino (Rivas *et al.*, 2003).

El agua de riego, contaminada con heces es otra fuente importante de ECEH O157:H7 en los vegetales (CFSPH). La contaminación fecal del agua también puede deberse a la descarga de materia fecal en aguas de recreación o en aguas de pozo que son consumidas por las personas sin previo tratamiento de purificación (Chinen *et al.*, 2003).

Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos y la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral. La propagación por contaminación de una persona a persona, observada en brotes, demuestra que la dosis infectante es muy baja (Piedrahita *et al.*, 2001). Se observa, sobre todo, en jardines maternos e infantiles, hogares para ancianos e instituciones para enfermos mentales (Griffin y Tauxe, 1991).

2.3.3 Dosis infecciosa de STEC O157:H7

Un número muy bajo de células de la bacteria *E. coli* O157:H7 se han detectado en los alimentos y aguas asociadas a brotes de enfermedades (Müller *et al.*, 2006). Se han notificado a ser tan bajo como 10 a 100 UFC/g o UFC/ml de alimento o agua analizada (Feng, 2000). Este bajo número de células son realmente suficiente para provocar manifestaciones clínicas en un hospedador (Mead y Griffin, 1998).

2.3 STEC y su problemática en salud pública

2.4.1 STEC O157:H7 en plantas de procesamiento de carne

La piel de ganado vacuno representa una especial preocupación de seguridad alimentaria, por la naturaleza del proceso de eliminación de la piel, puede ser que sea difícil evitar la transferencia de bacterias patógenas a la canal (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003). Otros estudios han establecido vínculos entre la incidencia de patógenos en cueros y en las canales derivados (Elder *et al.*, 2000).

STEC O157:H7 se deposita en la superficie de las canales bovinas durante el proceso de sacrificio (CCFH, 2005). Los agentes patógenos pueden ser transferidos a las superficies de la carne en una variedad de formas; es decir, desde cuchillos al cortar la piel, por contacto directo entre la superficie exterior de la piel y la carcasa durante el desolle, desde los equipos mismos o de las manos de los operadores durante el proceso de eliminación (Gill y Landers, 2004).

STEC O157:H7 está presente en la superficie de las canales, pues los tejidos internos de los músculos intactos normalmente están protegidos de la contaminación superficial durante el sacrificio.

El rápido enfriamiento de las canales espaciadas convenientemente, retarda el crecimiento de STEC O157:H7 en las superficies de la canal. La deshidratación superficial durante la refrigeración es un factor adicional que puede restringir el crecimiento (ICMSF, 1996).

La contaminación de la canal puede variar con la temporada, el diseño y operación de la planta, área geográfica, la ubicación dentro de la planta, y hasta cierto punto, el sitio anatómico de carcasa. También influye el número, frecuencia, el tiempo de muestreo, manejo, transporte, almacenamiento de la muestra, el tipo, la edad del bovino y el análisis logrando afectar la prevalencia de STEC O157:H7 (Elder *et al.*, 2000).

Un estudio realizado en varios frigoríficos de EE.UU. Se encontró una prevalencia de STEC O157:H7 de 28 % en materia fecal de bovinos antes del sacrificio; un 11 % de los cueros y 43% de las carcasas antes de la evisceración estaban contaminados; solo el 18 % mostró contaminación luego de la evisceración y un 2 % de los recortes fueron positivos a la bacteria (Michanie, 2003). En un estudio realizado en tres plantas de carne de vacuno del medio oeste encontraron que la prevalencia en piel era 10 veces mayor que la prevalencia fecal (60,6% vs. 5,9%) (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003).

2.4.2 STEC en carnes y sus productos

La carne de res mal cocida ha sido una pieza clave en los brotes de enfermedades de *E. coli* O157:H7. Los productos cárnicos pueden contaminarse durante la matanza y durante el proceso de molienda, pueden transferirse patógenos de la superficie de la carne al interior (Lim *et al.*, 2010). Las hamburguesas de origen bovino mal cocidas son los vehículos más peligrosos (Michanie, 2003).

Durante el proceso de recorte y posterior molienda el patógeno se distribuye en toda la carne molida. STEC puede sobrevivir durante al menos 9 meses en carne molida almacenada a -20°C. Tolerancia la acidez, y permanece infecciosa de semanas a meses en alimentos ácidos tales como la mayonesa, salchichas, sidra de manzana y queso cheddar a temperaturas de refrigeración. Además, resiste la desecación (CFSPH, 2010).

El calor desnaturaliza los microorganismos presentes en la carne y productos cárnicos. Para destruir a las EHEC se debe cocinar la carne molida de res hasta que todas las partes alcancen una temperatura mínima adecuada de 160°F (71.1 °C) (OMS, 2011).

Heuvelink *et al.* (1999) informaron 1,1% (6 /571) STEC O157:H7 en muestras de carne molida analizadas en los Países Bajos. En Francia, un estudio realizado por Vernozzy-Rozand *et al.* (2002) reportaron 0,12% (4/3450) de STEC O157:H7 en la prevalencia de carne picada. Un estudio realizado por Tarr *et al.* (1999) en EEUU no encontró STEC O157:H7 de 1 400 muestras de carne molida de res encuestados; no obstante, Samadpour *et al.* (2002) reportaron el 16,8% (50/296) de *E. coli* O157:H7 años más tarde.

También este serotipo fue hallado en 10% en muestras de carne de res mediante PCR en la India por Bindu y Krisnaiah (2010), el mismo porcentaje del 10% fue encontrado en carne molida en el país de Colombia (Piedrahita *et al.*, 2001), en España un 12% de *E. coli* O157:H7 fue encontrado en muestras de carne vacuno proveniente de carnicerías (Mora *et al.*, 2003) y en Paraguay se detectó 40% de este serotipo en hamburguesas crudas (Copes *et al.*, 2009). También se han reportado frecuencias menores; en Argentina se ha reportado 2.7% de *E. coli* O157:H7 en carne picada fresca (Marzocca *et al.*, 2006) y al siguiente año se detectó 1.2% en muestra de carne por Roldan *et al.* (2007), en Uruguay la frecuencia fue de 1.8% en carne picada fresca (Varela *et al.*, 2008) y 3.1% en carne molida en Venezuela (Bravo y Villalobos de Bastardo, 2002). Por otro lado también se reporta la presencia de STEC O157 estuvo presente en el 4.8% de salchichas frescas y el 3.3% de embutidos secos, en Argentina (Chinen *et al.*, 2001). Mientras que Dontorou *et al.* (2003) reportaron 1.3% STEC O157 en salchichas frescas tradicionales griegas. Como se evidencia en los trabajos reportados, Se han descrito diferentes metodologías para su detección y aislamiento a partir de productos cárnicos (Hussein y Bollinger, 2005). Sin embargo, es difícil comparar los resultados obtenidos en diferentes partes del mundo debido a la variedad de los procedimientos utilizados.

2.4.3 Incidencia de STEC en carnes en el Perú

En el Perú, son pocos los estudios que se han realizado con el objetivo de identificar STEC y más aún STEC O157:H7. Alfaro y Santana (2003) realizaron un estudio evaluando 407 muestras de carne de vacuno cruda entera y molida, queso fresco y verduras de tallo corto que se expenden en los mercados de Lima. Se identificó *E. coli* O157:H7 (mediante serología) en el 22.5% de las muestras de carne molida, 14.7% en las muestras de carne entera, 7.8% en las muestras de queso fresco y 4% en las muestras de verduras. De las muestras positivas, el 87.7% presentaron solo la toxina Stx2, mientras que el 14.3% presentaron ambas toxinas (Stx1-Stx2).

Mora *et al.* (2003) identificaron 50 aislamientos positivos a *E. coli* O157 (12.3%): 23/102 en muestras de carne molida de res, 15/102 en muestras de carne de vacuno, 8/102 en muestras de quesos de pasta blanda y 4/101 en vegetales frescos. En 35 cepas de *E. coli* O157 identificadas por serología, se identificaron los genes O157 rfbE, fliCh7, eae-g1 y ehxA. Además codificaron las toxinas Shiga de 33 aislamientos: (14%) codificaron stx1/stx2, mientras que el 80% codificó solo stx2. En otro estudio realizado en Lima de 98 locales de expendio de carnes rojas de diferentes mercados se identificó que el 22% de carne cruda presentó *E. coli* O157:H7 mediante serología (Méndez-Farro *et al.*, 2009). Un estudio reciente en Perú menciona cepas positivas (1.54%) a *E. coli* O157:H7 presente en carne molida fresca de bovino, recolectados de puestos de ventas de mercados en Lima (Méndez *et al.*, 2013).

2.4.4 STEC en productos no cárnicos

2.4.4.1 STEC O157:H7 en vegetales y frutas

Otros alimentos implicados como vehículos para la transmisión de *E. coli* O157:H7 incluyen el jugo de manzana no pasteurizado (pH 3,5), jugos de naranja (Just y Daeschel, 2003), mayonesa (Weagant *et al.*, 1994), productos de hoja fresca listos para comer o para cocinar pizzas (tomates, lechugas, espinaca, cebollas y zanahorias; especialmente éstas son usadas en ensaladas (Solomon *et al.*, 2002).

La causa más común de la presencia de STEC O157:H7 en vegetales, es el uso de agua de irrigación o deyecciones ganaderas en el crecimiento de frutas y vegetales. Brotes de enfermedades causadas por STEC han sido asociados con el consumo de lechugas frondosas, papas, brotes de rábano y brotes de alfalfa (Johannessen *et al.*, 2005).

Este organismo se puede adherir a las plantas, y sobrevive bien en la superficie de una variedad de frutas, vegetales y hierbas culinarias frescas. STEC O157:H7 puede internalizarse en los tejidos de algunas plantas, entre ellas la lechuga, donde es posible que no sea susceptible al lavado (CFSPH, 2010). Las moscas de la fruta pueden transmitir este organismo a las plantas, donde se pueden multiplicar en los tejidos dañados. STEC O157:H7 puede permanecer viable por largos periodos en muchos productos alimenticios (CFSPH, 2010).

2.4.4.2 STEC en leche y productos procesados

Los productos lácteos fueron implicados como vehículos de transmisión en Egipto en 1994, se detectó *E. coli* O157:H7 en el 6% de las muestras de leche no pasteurizada (OMS, 1997). La contaminación de la leche por *E. coli* O157:H7 ocurre durante el proceso de lechería, debido a la contaminación de la leche durante la colección y/o procesamiento (Karmali, 1987).

Alimentos procesados como yogurt, quesos, salchichas cocidas han sido involucrados en brotes de origen alimentario causados por STEC O157:H7. La bacteria ha sido aislada de sándwich de queso, confirmando su crecimiento bajo condiciones ácidas (Karmali *et al.*, 1987).

2.4.4.3 STEC en aguas

Las malas condiciones de saneamiento e higiene, así como la falta de conciencia ambiental entre la población es considerada como una de las principales causas de la contaminación de fuentes de agua. Ejemplos de esto es la disposición inadecuada e incontrolada de residuos, bañarse y nadar en las fuentes de agua como ríos y represas, que sirven como fuentes de suministro de agua municipal y el pastoreo de ganado junto a las cuencas (Zamxaka *et al.*, 2004; Phaswana-Mafuya, 2006).

El defecar en campo abierto es una fuente de contaminación del agua, sobre todo a las comunidades que utilizan fuentes de agua superficial. Las aguas de piscinas están contaminados con *E. coli* O157:H7 cuando las personas que llevan las bacterias nadan en esas aguas. El uso de aguas residuales en el campo también puede conducir a la contaminación de las cuencas hidrográficas con agentes patógenos causantes de enfermedades. El origen y el tipo de agua utilizada para el riego son, por tanto, los factores de riesgo (Zamxaka *et al.*, 2004).

2.4 STEC en humanos

La mayoría de las muertes a causa de la *E. coli* O157:H7 ocurren en niños menores de 5 años de edad y las personas mayores. El tiempo de la exposición hasta la aparición de los síntomas varía de 1-14 días con un promedio de 4. La duración de la enfermedad es de 2 a 9 días; Sin embargo, con las complicaciones de la enfermedad puede durar muchos meses y provocar daños permanentes o incluso la muerte (Duffy *et al.*, 2006).

La Unión Europea tiene un promedio de 0,75 casos por cada 100.000 habitantes (EFSA, 2011). En Uruguay ocurren entre 10 y 15 casos nuevos por año, y la tasa de incidencia es de 4 a 5/100.000 niños menores de 5 años, aproximadamente. En Argentina la OPS considera que el SUH es endémico, con 400 casos nuevos por año y una incidencia estimada para el año 2005 de 13,9/100.000 niños menores de 5 años (Rivas *et al.*, 2006).

El costo anual de las enfermedades por *E. coli* O157: H7 fue de 405 millones de dólares, incluyendo la pérdida de productividad, la atención médica, y las muertes prematuras. El alto costo de la enfermedad requiere de esfuerzos adicionales para controlar este patógeno (Mead y Griffin, 1998). El centro de control y prevención de enfermedades ha estimado que las infecciones *E. coli* O157:H7 causan 73000 enfermedades, 2200 hospitalizaciones y 60 muertes anualmente en los Estados Unidos (Frenzen *et al.*, 2005).

El SUH es una entidad clínica y anátomo patológica se caracteriza por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e insuficiencia renal aguda, que puede afectar otros parénquimas como intestino, páncreas, corazón y sistema nervioso central (Griffin y Tauxe, 1991).

SUH puede presentar dos formas, una típica de etiología infecciosa, precedida por un período prodrómico con diarrea, generalmente sanguinolenta y de características endemoepidémicas (llamada D+), y otra forma atípica (D-) desencadenada por varios factores, como drogas, transplantes de órganos, post parto, etc (Karmali *et al.*, 1987). Estudios poblacionales sugieren que aproximadamente el 90% de los casos de SUH están precedidos por diarrea (Siegler *et al.*, 1994).

Los niños constituyen el grupo más vulnerable, con una mayor incidencia de infecciones sintomáticas por STEC y riesgo alto de evolución a SUH (Mead y Griffin, 1998). Es la primera causa de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica en niños. Generalmente la disfunción renal se prolonga varios años con serias limitaciones en la dieta de la persona afectada. En Argentina el 20% de niños y adolescentes que reciben trasplante renal, han padecido SUH (MSAN, 2005).

Las potentes toxinas de STEC pueden causar inicialmente una forma particularmente severa de la enfermedad humana, colitis hemorrágica (CH). Alrededor del 10% de estos pacientes desarrollan SUH, siendo más común en bebés, niños, ancianos y aquellos con función inmune comprometido (Paton y Paton, 2000).

La mayoría de los pacientes con SUH se recuperan, el 2-7% de los pacientes con SUH mueren, pero que en algunos brotes entre los ancianos, la tasa de mortalidad ha sido tan alta como el 50% (OMS, 1997), otros pueden desarrollar accidentes cerebrovasculares (Griffin y Tauxe, 1991) o la insuficiencia renal crónica (Siegler *et al.*, 1991). Otros síntomas de la infección por STEC incluyen la diabetes mellitus y la colitis necrotizante. A largo plazo, la disfunción renal se presenta en un 10-30% aproximadamente de los sobrevivientes de SUH (Paton y Paton, 2000).

La anemia hemolítica microangiopática es producida por el traumatismo mecánico que sufren los hematíes al circular por el lecho vascular alterado o por el estrés oxidativo sobre los hematíes. En relación a la insuficiencia renal aguda se producen con frecuencia un cuadro clínico de hipertensión arterial, alteraciones hepáticas y alteraciones neurológicas. Los riñones son los órganos terminales más

afectados, pero puede ocurrir la necrosis isquémica de los intestinos, sistema nervioso central (derrame cerebral) y en cualquier otro órgano (Nataro y Kaper, 1998; Paton y Paton, 2000).

Los humanos pueden infectarse de forma asintomática o pueden desarrollar diarrea acuosa, colitis hemorrágica y/o síndrome urémico hemolítico. Por lo general, la enfermedad comienza con cólicos abdominales y luego diarrea, que inicialmente es líquida, pero se vuelve extremadamente sangrienta dentro de 2-3 días (CFSPH, 2010).

Algunos casos se resuelven sin tratamiento en aproximadamente una semana, otros evolucionan a CH en unos días, que se caracteriza por diarrea con sangre profusa y visible, acompañada de distensión abdominal y, en muchos casos, espasmos abdominales. Algunos pacientes presentan fiebre baja, en otros, la fiebre está ausente. Se pueden observar náuseas y vómitos, y es posible la deshidratación. Muchos casos de CH se resuelven en aproximadamente una semana. La colitis grave puede provocar necrosis intestinal, perforación o el desarrollo de estenosis en el colon (CFSPH, 2010).

La forma del SUH que generalmente se observa en adultos, especialmente ancianos, en ocasiones se denomina púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). En la PTT, habitualmente se produce menor daño renal que en los niños, pero son más comunes los signos neurológicos que incluyen accidente cerebro vascular, convulsiones y deterioro del SNC. La muerte se produce con mayor frecuencia en los casos con enfermedad extra renal grave con signos en el SNC. Aproximadamente el 65-85% de los niños se recupera del SUH sin daños permanentes; sin embargo, también se producen complicaciones renales crónicas que incluyen hipertensión, insuficiencia renal e insuficiencia renal en la etapa terminal. Son posibles, problemas extrarrenales residuales tales como diabetes mellitus insulino dependiente de forma transitoria o permanente, insuficiencia pancreática, complicaciones gastrointestinales o defectos neurológicos tales como disminución en la coordinación motora fina (CFSPH, 2010).

2.5.1 Casos de *E. coli* O157:H7 en humanos en el Perú

El INS realizó un estudio con pacientes del Hospital Nacional Cayetano Heredia y de Canto Grande, reportando la presencia de *E. coli* O157 y O126, sin encontrar la presencia de las toxinas. Posteriormente, se recibió la confirmación 7 cepas de *E. coli* O157 procedentes de un estudio realizado por Salazar y Bravo, quienes evaluaron a niños con diarrea sanguinolentas en el Hospital Nacional Cayetano Heredia (HNCH), entre 1998-1999, resultando positivos a la serología, pero sin presencia de la toxina (INS, 2005).

Huapaya *et al.* (2001) reportaron el primer aislamiento confirmado de *E. coli* O157:H7 positivo por PCR al gen *stx2* en un lactante menor de 11 meses de edad que presentó un cuadro de diarrea disintérica en Tacna, Perú.

Entre 2003 y marzo 2005 se presentaron 11 casos de *Escherichia coli* O157 procedentes de Arequipa, Lima, Puno y La Libertad, confirmando la asociación entre SHU y el serotipo O157:H7 solo en un caso en Lima (Huapaya *et al.*, 2005).

Ochoa *et al.* (2011) reportaron en niños menores de dos años de zonas periurbanas de Lima, una frecuencia de aislamiento de STEC de 0.5% y 1.2% en niños con diarrea y sin diarrea respectivamente, donde todas las cepas de STEC fueron *stx1+* y *eae+*. De estos porcentajes se dividió en 2 grupos (<, > de 6 meses), en los menores de 6 meses se reportó 0.3% de STEC en niños con diarrea y no se encontró ninguna cepa en los niños controles; a su vez en los mayores de 6 meses se detectó 0.8% de STEC en niños con diarrea y 1.8% de STEC en niños controles.

Contreras *et al.* (2011) determinaron en niños menores de 36 meses de edad una prevalencia de STEC de 0.4% (14/3,219) en los casos de diarrea y 0.6% (15/2,695) en los controles sanos. Ninguno de los niños presentó síndrome urémico hemolítico u otras complicaciones y en solo un caso de los niños infectados con STEC se observó una muestra con sangre. De los genes de virulencia evaluados *stx1* tuvo una prevalencia de 83%, *stx2* en 17%, el gen *eae* (intimina) en 72%, *exhA* (EHEC hemolisina) en 59% y *astA* (EAST1) en 14%.

Llanos *et al.* (2012) evaluaron 131 muestras de diarrea con sangre de niños menores de 5 años, donde se identificó STEC en el 9.2% de todas las muestras, asociando la presencia de STEC en cuadros de diarrea sanguinolenta con la ausencia de fiebre.

2.5 STEC en animales

La enfermedad del edema del lechón es una enfermedad seria y frecuentemente mortal relacionada principalmente con STEC, caracterizada por síntomas neurológicos incluyendo ataxia, convulsiones y parálisis (Quinn *et al.*, 2002). Cepas de ETEC y STEC también han sido asociadas a cuadros de diarrea pre y pos destete en lechones (Blanco *et al.*, 2006), terneros y vacas, cabritos y corderos, gatos (Paton y Paton, 2000) y perros (Hammermueller *et al.*, 1995).

A pesar que en los bovinos la infección por STEC es frecuentemente asintomática, se presentan casos esporádicos de diarrea en los terneros por este patotipo. Estudios experimentales y naturales han demostrado que STEC O157:H7 y STEC O111 pueden colonizar transitoriamente la mucosa intestinal de bovinos adultos y terneros, pero sólo en los terneros neonatos pueden desarrollaron importantes lesiones intestinales (Paton y Paton, 2000). Otros serotipos de STEC también han sido detectados con frecuencia en casos naturales de diarreas en terneros y en vacas , entre ellos los serotipos O15, O20, O103, O157, O5:H-, O8:H19, O26:H-, O26:H11, O113:H21, O157: H7, O157:H-(Hornitzky *et al.*, 2005).

2.6 Consumo de carne de bovino y producción en el país

Según el Instituto de Estadística e Informática del Perú (INEI) la actividad agropecuaria aporta al país el 7.5% del producto bruto interno y absorbe el 37.8% de la población económicamente activa (INEI, 2012).

El subsector pecuario participa del 40.9% de la actividad agropecuaria peruana. El 18% del subsector pecuario consiste en explotación de vacunos en el país, repartida entre la ganadería vacuna de carne y el ganado lechero, que a su vez representa el 7.4% y 4.2% de la producción agropecuaria del Perú, respectivamente (MINAG, 2011). Del total de la ganadería vacuna existente en el país, aproximadamente un 80% se encuentra en la Sierra, dirigida principalmente al mercado local y auto

consumo; y Selva, bajo sistemas de producción extensiva o semi-intensivo; y el 20% restante en la Costa, principalmente en condiciones de crianza intensiva; siendo la mayor proporción en todo el país el ganado del tipo criollo (INEI, 2012; MINAG, 2013).

En el Perú, un vacuno produce el 51% de su peso en carcasa y 25% en menudencia. El Perú poseía 5 520 200 cabezas de ganado vacuno en el 2010. El total de saca de bovinos a nivel nacional fue de 1 218 723 unidades, produciendo 171 872 toneladas de carne, y en promedio 141 kilogramos de carne por animal, respectivamente (MINAG, 2011).

Si bien la carne de vacuno es la tercera carne mas consumida en el país, el consumo per cápita de este alimento ha aumentado con el tiempo, de 5.649 Kg/hab/año en el 1990 a 5.837 Kg/hab/año en el 2010 (MINAG, 2011).

2.7 Métodos de detección de STEC en alimentos

2.8.1 Cultivo bacteriano e identificación bioquímica

Generalmente las cepas de *E. coli* se seleccionan a partir de placas de agar cultivadas a 37°C o 42°C después de la identificación visual presuntiva. Sin embargo, este método debe emplearse con precaución, ya que sólo alrededor del 90% de las cepas de *E. coli* son lactosa positiva. La mejor prueba para la diferenciación de *E. coli* de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* es la prueba de indol ya que el 99% de cepas de *E. coli* son positivas (Nataro y Kaper, 1998).

En el laboratorio clínico, el cultivo y el análisis bioquímico es el "estándar de oro" para la identificación de STEC O157. A pesar de que no existen características bioquímicas comunes entre la gran mayoría de los serotipos de STEC hay algunas características bioquímicas de STEC O157 que se usan para su aislamiento e identificación (CDCP, 2012).

2.8.2 Aglutinación

La técnica de serotipificación usa la prueba de aglutinación en portaobjetos con antisueros dirigidos contra los antígenos somático (O) y flagelar (H). Esta prueba se utiliza como ayuda en el diagnóstico de DEC y se basa en la asociación de ciertos serotipos a una determinada categoría (Quinn

et al., 2002). Se ha demostrado que la serotipificación no es un método adecuado para la identificación de las DEC, debido a que sólo son útiles para la identificación de un número limitado de serogrupos (Quinn *et al.*, 2002).

La prueba para detectar el antígeno H7 tiene una sensibilidad del 96% y una especificidad del 100% en comparación con el método de aglutinación en tubo estándar con antisueros de referencia. Aunado a su limitada sensibilidad y especificidad el serotipado es tedioso, caro y se realiza de manera fiable sólo por un pequeño número de laboratorios de referencia, por lo que se recomienda efectuar el análisis serológico junto con otra (Quinn *et al.*, 2002).

2.8.3 ELISA

Pruebas comerciales con altos porcentajes de sensibilidad y especificidad para la detección del antígeno O157 y H7 en las heces y cultivos de heces están disponibles (Premier *E. coli* O157 e Immuno Card STAT *E.coli* O157:H7, Meridian Diagnostics, Inc.). Sin embargo, los resultados positivos a estos ELISA deben considerarse presuntivos y deben ser confirmados mediante pruebas para la detección de las shigatoxinas (CDCP, 2009).

La única prueba para la detección de Stx1 y Stx2 aprobada por la FDA, es la prueba Premier EHEC (Meridian Diagnostics, Inc.) capaz de detectar las shigatoxinas en cultivos bacterianos, muestras de alimentos y en muestras de heces frescas o congeladas.

2.8.4 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR) permite producir múltiples copias de un fragmento de ADN específico *in vitro*, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Esta metodología se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Esta enzima requiere de una secuencia corta de ADN con un extremo 3' OH libre para comenzar a funcionar, esta secuencia recibe el nombre de cebador (del inglés “primer”) permitiendo la detección de determinado locus de virulencia (Zambrano, 2012).

A nivel mundial se han desarrollado una variedad de protocolos de PCR usando diferentes cebadores dirigidos para los principales factores de virulencia de *E. coli*. El uso del PCR para la detección de los genes de la shigatoxina es utilizada para el diagnóstico de STEC O157:H7, STEC O157 y STEC no O157. Diferentes estudios han empleado principalmente el PCR para la detección de los genes que codifican la Stx1 y Stx2 (Blanco *et al.*, 2006) y también para los genes que codifican para la intimina, el plásmido pO157, la enterohemolisina de EHEC (Blanco *et al.*, 2004), el lipopolisacárido O157 (Maurer *et al.*, 1999) y el antígeno flagelar H7 (Gannon *et al.*, 1997).

Existen numerosas técnicas de PCR múltiple para un sólo patotipo de DEC. Existen las dirigidas a la detección de STEC en base a la presencia de los genes que codifican sólo los cebadores para Stx1 y Stx2 (Leotta *et al.*, 2005), las que combinan cebadores para las shigatoxinas y la intimina y las que, además de los mencionados adicionan cebadores para la enterohemolisina de EHEC (Paton y Paton, 2000).

Existen PCR múltiple que usan como blanco genes que codifican el antígeno H7 para el diagnóstico de STEC O157:H7, O157: NM, y otras cepas de EHEC mediante el uso de cebadores para los genes de la unidad estructural del antígeno H y H7 (*fliCH* y *fliCH7*) en combinación con cebadores para *stx1*, *stx2* y *eaeA* (Gannon *et al.*, 1997), un año después Nagano *et al.* (1998) reportan un PCR múltiple que usa cebadores para *fliC* de H7 y para *rfbE* de O157 de *E. coli* O157:H7, en combinación con cebadores para los genes *stx1* y *stx2*.

Cada ciclo de la reacción de PCR se lleva a cabo en tres pasos (Méndez y Roth, 2004):

a) Desnaturalización. Para que comience la reacción es necesario que el ADN templado se encuentre como simple cadena, para ello se debe calentar a temperaturas cercanas al punto de ebullición (90-95°C) durante unos minutos, lo que provocará la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas.

b) Hibridación o fase de “annealing”: Una vez desnaturalizado el ADN se disminuye la temperatura hasta un rango entre 40-60 °C para conseguir que cada “primer” se una a su región específica dentro de la cadena de ADN.

c) **Extensión:** Consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa, ésta incorpora nucleótidos en el extremo 3' OH del “primer”, utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq* polimerasa alcanza su máxima actividad.

La repetición de los ciclos de PCR permite la amplificación del ADN en forma exponencial, pudiéndose obtener aproximadamente 1.000.000 de copias a partir de un solo fragmento de ADN original luego de 20 ciclos.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio y tiempo

Las muestras se obtuvieron de canales de bovinos en dos centros de beneficio comercial, ubicados en la ciudad de Lima durante los meses de Enero-Mayo del 2013. La primera parte de las muestras se trabajó en el Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La segunda parte de las muestras se trabajó en el laboratorio de Biología Molecular de la empresa Bioservice S.R.L.

3.2 Tamaño muestral y toma de muestra

El tamaño de muestra (n=179) se obtuvo utilizando la fórmula para poblaciones infinitas (Daniel, 1996) con un nivel de confianza del 90% (d=0.02) y usando el 2.7 % como prevalencia de referencia (Varela-Hernández *et al.*, 2007).

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{e^2}$$

Donde:

n= Tamaño de la muestra

z= 1,65 para el 90% de confianza

p= Frecuencia esperada del factor a estudiar 2.7 % (0.027)

$$q = 1 - p (0.973)$$

e= Precisión o error admitido (0.02%)

Se realizó un muestreo por conveniencia de dos mataderos autorizados de bovinos en Lima. El tamaño muestral mínimo 179 se estratificó entre ambos mataderos y considerando que uno de ellos beneficia el doble de animales, se decidió obtener 120 (60 y 60) muestras de un matadero y 60 (30 y 30) del otro. El total de las muestras fueron tomadas en la zona de oreo y fue dividido en: 90 canales inmediatamente después del lavado e inicio de oreo (momento que denominamos LAVADO) y 90 canales en la playa de oreo, luego de 2-3 h desde el primer momento, mientras las canales se enfrían y desecan antes de ser comercializadas (momento que denominados OREO). Con la ayuda de plantillas esterilizadas de 10x10 cm se realizaron hisopados de la superficie muscular de cada canal en cuatro puntos (Moreno, 1991): músculo cervical, músculo pectoral, músculo recto abdominal, músculo semitendinoso (Figura 1), abarcando 100 cm² en cada punto y tomando un total de 400 cm² por cada canal, como lo mencionado por Lindbland (2007). Los 4 hisopos obtenidos después del hisopado de la superficie de la canal, fueron colocados en frascos que contenían 40 ml de agua peptonada esteril. Luego las muestras se transportaron en una caja térmica con geles refrigerantes (4°C) hacia el laboratorio y se procesaron dentro de las 24 horas de haber sido recolectadas.

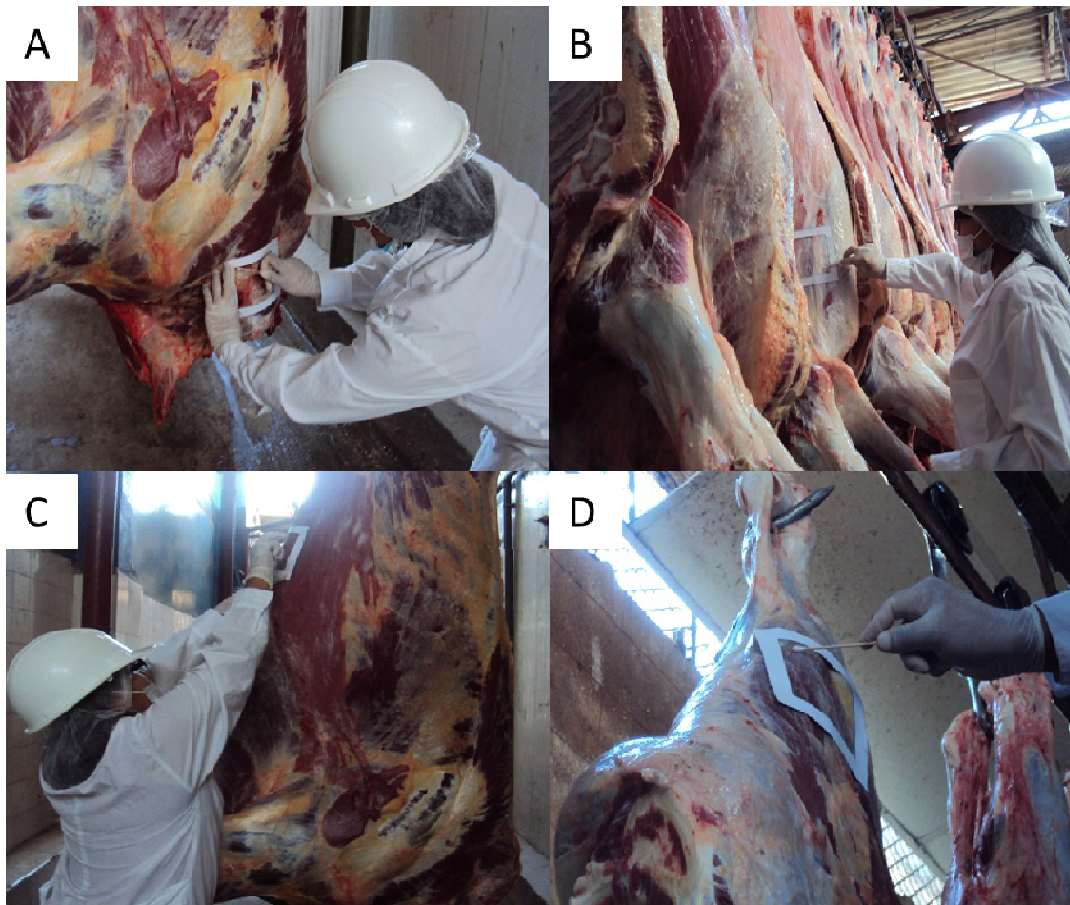


Figura 1. Puntos anatómicos tomados en el hisopado de las canales bovinas. A: toma de muestra en región cervical; B: toma de muestra en región pectoral; C: toma de muestra en región abdominal; D: toma de muestra en región del miembro superior

3.3 Procesamiento microbiológico y bioquímico de las muestras

En el laboratorio se procedió a realizar la etapa de enriquecimiento para recuperar los microorganismos patógenos, que se encuentran en bajo número por la elevada concentración de microorganismos comensales; así como también, se aplicaron dos protocolos microbiológicos:

a) El protocolo microbiológico MAC, en el cual se usa un medio convencional (agar McConkey) para detectar *E. coli* fermentadora de lactosa: Para lo cual se tomó 1 ml de la muestra y se inoculó en el medio de enriquecimiento caldo tripticasa soya (18-24 horas a 37°C), luego se sembraron en Agar McConkey (18-24 horas a 37°C), donde el crecimiento de colonias rojas es compatible con *E. coli*.

b) El protocolo microbiológico SMAC, en el cual se usa un medio selectivo (agar McConkey con sorbitol) para *E. coli* O157:H7 que detecta *E. coli* no fermentadoras de sorbitol: Para lo cual se tomó 1 ml de la misma muestra y se inoculó en el caldo EC modificado con novobiocina 20µg/ml (18-24 horas a 37°C), la inclusión de novobiocina ha sido también reportado para incrementar la selección para *E. coli* O157:H7 (Okrend *et al.*, 1990). luego se sembraron en Agar McConkey con sorbitol (18-24 horas a 37°C), donde el crecimiento de colonias incoloras es compatible con *E. coli* no fermentadora de sorbitol.

Para confirmar las cepas compatibles con *E. coli* se les aplicaron las pruebas bioquímicas, ya mencionadas, luego fueron incubadas en la estufa por 24 horas a 37°C. Una vez confirmadas las cepas positivas a *E. coli* fueron resembradas en viales con medio de conservación agar tripticasa de soya (TSA) y guardadas en refrigeración para luego ser procesadas en el laboratorio de biología molecular.

3.4 Procesamiento de las cepas mediante PCR

Para la confirmación STEC O157:H7, se utilizó la técnica de PCR múltiple validada y estandarizada por Mori (2013).

3.4.1 Extracción del ADN por la técnica de ebullición

Se tomó una ansada, en condiciones de esterilidad, de los viales con *E. coli* confirmados y se inoculó en un tubo conteniendo caldo TSB e incubado a 37°C por 24 h. Posterior a ello, una ansada se sembró en Agar McConkey (37°C por 18–24 h), luego se tomó las colonias típicas de *E. coli* y se colocó en un vial con TSB, para luego extraer el ADN, según la técnica descrita a continuación (Mori, 2013):

1. Centrifugar 1 ml caldo (previamente 24 h de incubación) a 13000 rpm x 5 minutos
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 500 ul buffer TE1X (Tris EDTA)
3. Homogenizar y poner parafilm
4. Ebullicir a 100°C x 10 minutos
5. Retirar parafilm y centrifugar a 13000 rpm x 5 minutos
6. Poner sobrenadante en nuevo vial (1.5 ml) y congelar
7. Almacenar el DNA resuspendido a -20°C.

3.4.2 PCR múltiple

Para la confirmación de cepas de STEC, así como el subtipo EHEC y serotipo O157:H7, se utilizó la técnica de PCR múltiple validada y estandarizada por Mori (2013). El análisis fue dividido en dos PCR múltiples para facilitar la lectura del gel de electroforesis y agilizar el trabajo (Mori, 2013). Los PCR fueron llevados a cabo con un volumen final de 20 µl. Los materiales utilizados en la mezcla maestra son detallados en los cuadros 1 y 2. Los primers utilizados en el PCR múltiple se detallan en el cuadro 3. Seis primers fueron utilizados: amplificando los genes *stx1A* y *stx2A* para detectar STEC, *hlyA* y *eaeA* para determinar el subgrupo EHEC, y los genes *rfbO157* y *fliCH7* para determinar la presencia del serotipo O157:H7.

Cuadro 1. Componentes usados en el PCR múltiple 1 (Mori, 2013)

Mix reactivo PCR 1	Volumen
BufferNH ₄ SO ₄ (10X)	2ul
MgCl ₂ (25mM)	1.6ul
dNTPs (2,5 Mm)	1.6ul
Lp43 (10 pmol/ul)	0.1ul
Lp44 (10 pmol/ul)	0.1ul
Lp30 (10 pmol/ul)	0.14ul
Lp31 (10 pmol/ul)	0.14ul
Int-Fc (10 pmol/ul)	0.2ul
Int-Rc (10 pmol/ul)	0.2ul
PR8 (10 pmol/ul)	0.09ul
PF8 (10 pmol/ul)	0.09ul
H ₂ O para PCR	11.64 ul
Taq Polymerasa (5u/ul)	0.1ul
Total	18 ul

Cuadro 2. Componentes usados en el PCR múltiple 2 (Mori, 2013)

Mix reactivo PCR 2	Volumen
Buffer NH ₄ SO ₄ (10X)	2ul
MgCl ₂ (25mM)	1.6ul
dNTPs (2,5 Mm)	1.6ul
Hly A-F (10 pmol/ul)	0.4ul
Hly A-R(10 pmol/ul)	0.4ul
FLICH-F(10 pmol/ul)	0.2ul
FLICH-R(10 pmol/ul)	0.2ul
H ₂ O para PCR	11.5ul
Taq Polymerasa (5u/ul)	0.1ul
Total	18 ul

Cuadro 3. Cebadores usados en PCR múltiple para la detección de patotipos *Escherichia coli* (STEC y EHEC O157:H7) presentes en el proceso de beneficio bovino (Mori, 2013).

Gen blanco	Cebador	Secuencia 5' – 3'	Tamaño (pb)	Referencia
Toxina Shiga1 (stx1A)	LP30	CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG	348	Cebula <i>et al.</i> (1995)
	LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG		
Toxina Shiga 2 (stx2A)	LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	584	Cebula <i>et al.</i> (1995)
	LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC		
Intimina (eaeA)	Int-Fc	CCGGAATTCGGGATCGATTACCGTCAT	840	Batchelor <i>et al.</i> (1999)
	Int-Rc	CCCAAGCTTTTATTTATCAGCCTTAATCTC		
Antígeno somático O157 (rfbO157)	PF8	CGTGATGATGTTGAGTTG	420	Maurer <i>et al.</i> (1999)
	PF8	CGTGATGATGTTGAGTTG		
Antígeno flagelar H7(fliCH7)	FLICH7F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625	Gannon <i>et al.</i> (1997)
	FLICH7R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC		
Enterohemolisina (hlyA)	hlyA-F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	Paton y Paton (1998)
	hlyA-R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		

Se trabajó en un volumen final de 20 ul en la zona sucia se agregó 2 ul de ADN para así completar los 20 ul. Los viales con 20 ul se llevaron al termociclador y se emplearon diferentes condiciones de temperatura y tiempo, durante aproximadamente 1h 42 minutos. El PCR fue desarrollado con los pasos y condiciones para el termociclador mencionados a continuación:

- ✓ Desnaturalización inicial: 1 ciclo a 95°C en 4 min
- ✓ Desnaturalización: 30 ciclos a 94°C en 30 s
- ✓ Alineamiento: 30 ciclos a 53°C en 1 min
- ✓ Extensión inicial: 30 ciclos a 72°C en 1 min
- ✓ Extensión final: 1 ciclo a 72°C en 5 min

3.4.3 Electroforesis

Se utilizó gel agarosa al 1% (1 g y 100 ml TBE 1X), una vez que los pocillos estuvieron listos ya en la cámara de electroforesis, se colocó en los extremos 2ul de un marcador de peso molecular 100 pb (ladder); esto es para determinar el tamaño de bandas, posteriormente 2ul de buffer de carga BLG 3X y 3ul de cada vial, que contenían los productos del PCR. Se programó a 100 voltios por 30 minutos. Luego de este tiempo el gel fue llevado a bromuro de etidio por 20 minutos. Para después observarse las bandas de ADN en la cámara de transiluminador de luz ultravioleta, utilizándose una máquina fotográfica conectada al transiluminador para capturar de la imagen.

3.5 Cepa positiva a STEC O157:H7

Los criterios para decidir que una cepa es STEC O157:H7, se necesita que los ensayos de PCR señalen que dicha cepa posee los genes *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA*, *rfbO157* y *fliCH7*.

3.6 Análisis de resultados

Con la ayuda del paquete estadístico SPSS versión 22.0 se determinó: la frecuencia de *E. coli*, *E. coli* no fermentadora de sorbitol, STEC, EHEC y *E. coli* O157:H7 en la playa de oreo en 2 momentos: momento denominado LAVADO (inmediatamente después del lavado e inicio de oreo) y momento denominado OREO (2-3 h en la sala de oreo). Se determinó si existe asociación entre el matadero evaluado, el momento del muestreo y la presencia de *E. coli*, STEC, EHEC y *E. coli* O157:H7, mediante la prueba de χ^2 .

Asimismo, se determinó si existe concordancia entre el uso de la metodología MAC y SMAC y la presencia de STEC, EHEC y *E. coli* O157:H7. Este grado de concordancia se midió con el coeficiente de Kappa. Las tablas de contingencia siguieron el formato:

		Tipo de muestra A		Total (%)
		Negativo (%)	Positivo (%)	
Tipo de muestra B	Negativo	a	b	r
	Positivo	c	d	s
Total (%)		t	u	N

El coeficiente de Kappa tiene la siguiente fórmula:

$$k = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde:

Po = Proporción de acuerdos observado

$$Po = \frac{a + d}{N}$$

Pe = Proporción de acuerdos por azar

$$Pe = \frac{rt + su}{N^2}$$

IV. RESULTADOS

El $29.4\% \pm 7\%$ (53/180) y el $5.6\% \pm 4\%$ (10/180) del total de canales bovinas evaluadas fueron positivas a *E. coli* y *E. coli* productora de toxina tipo shiga (STEC), respectivamente. *E. coli* fue detectada en un 34.4% (31/90) en LAVADO y 24.4% (22/90) en OREO ($p>0.05$). Se encontró la misma frecuencia de STEC (5/90) en ambos momentos del beneficio (Figura 2). No hubo diferencia significativa entre la frecuencia de *E. coli* o STEC y el matadero evaluado. Las *E. coli* no fermentadoras de sorbitol (NFS) halladas mediante SMAC representaron el 4.4% del total, hallándose exclusivamente en al final del lavado.

El 26.7% de canales bovinas fueron positivas a *E. coli* usando la metodología MAC y el 4.4% fueron positivas a *E. coli* no fermentadoras de sorbitol usando la metodología de SMAC (Cuadro 4), presentando una pobre concordancia ($K=0.034$), $p>0.05$.

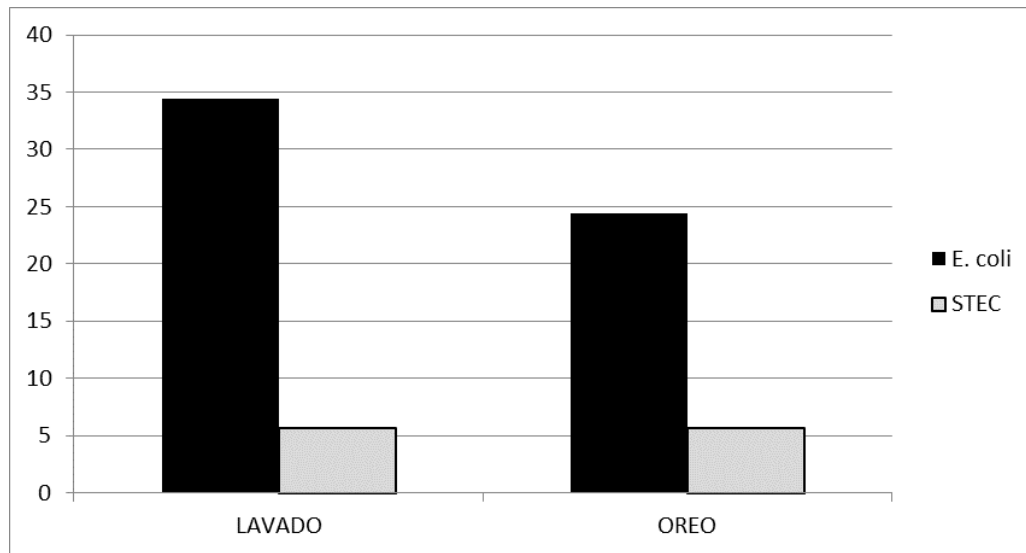


Figura 2. Frecuencia de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* productora de toxina tipo shiga (STEC) en canales bovinas en dos momentos de la playa de oreo: LAVADO (al final del lavado e inicio de oreo) y OREO (2-3 h en la playa de oreo).

Cuadro 4. Tabla de contingencia de las variables canales positivas a *E. coli* mediante los protocolos microbiológicos MAC y SMAC en centros de beneficio de bovinos en Lima.

		Protocolo microbiológico SMAC		Total
		Canales Negativas	Canales Positivas	
Protocolo microbiológico MAC	Canales Negativas	127 (70.6 %)	5 (2.8%)	132 (73.3%)
	Canales Positivas	45 (25%)	3 (1.7%)	48 (26.7%)
Total		172 (95.6%)	8 (4.4%)	180 (100%)

- MAC: Técnica microbiológica de detección de *E. coli* fermentadora de lactosa.
- SMAC: Técnica microbiológica de detección de *E. coli* no fermentadoras de sorbitol (NFS) usando medios selectivos.

El 16.7% (8/48) de los *E. coli* detectados mediante MAC, resultaron positivos a STEC (Cuadro 5). Sin embargo, la concordancia entre usar esta metodología y encontrar positivos a STEC fue pobre (K=0.203), $p<0.01$. El 37.5% (3/8) de los *E. coli* no fermentadores de sorbitol aislados resultaron positivos a STEC (Cuadro 5). Sin embargo, se halló una pobre concordancia entre el usar la metodología SMAC y encontrar cepas de STEC (K=0.299), $p<0.01$.

Cuadro 5. Tablas de contingencia de las variables canales positivas a STEC mediante los protocolos microbiológicos MAC y SMAC en centros de beneficio de bovinos en Lima.

Metodología	Canales	STEC		Total	Concordancia (K)*
		Cepas Negativas	Cepas Positivas		
Protocolo MAC	Negativo	130 (72.2%)	2 (1.1%)	132 (73.3%)	K=0.203
	Positivo	40 (22.2%)	8 (4.4%)	48 (26.7%)	
Total		170 (94.4%)	10 (5.6%)	180 (100%)	
Protocolo SMAC	Negativo	165 (91.7%)	7(3.9%)	172 (95.6%)	K=0.299
	Positivo	5 (2.8%)	3 (1.7%)	8 (4.4%)	
Total		170 (94.4%)	10 (5.6%)	180 (100%)	

(*)K: Índice de Kappa

Se aislaron 69 cepas de *E. coli* de las 53 canales que resultaron positivas, 31 en OREO y 38 en LAVADO. El PCR múltiple utilizado en el presente estudio detectó factores de virulencias entre las cepas de *E. coli* aisladas. El 18.85% de las cepas analizadas (13/69) presentaron al menos un gen evaluado al PCR múltiple (Figura 3). 11 (15.9%) cepas, correspondientes a 10 canales, fueron positivos a STEC. El 10.1% (7/69) de las cepas de *E. coli* presentaron el gen *stx2*, 4.4% (3/69) presentaron el gen *stx1*, 1.5% (1/69) presentó el gen *stx1* y *eaeA* y 2.9% (2/69) presentó *E. coli* O157.

Una cepa resulto STEC O157 positiva y 10 cepas fueron STEC no O157 (Cuadro 6). No se detectó *E. coli* O157:H7.

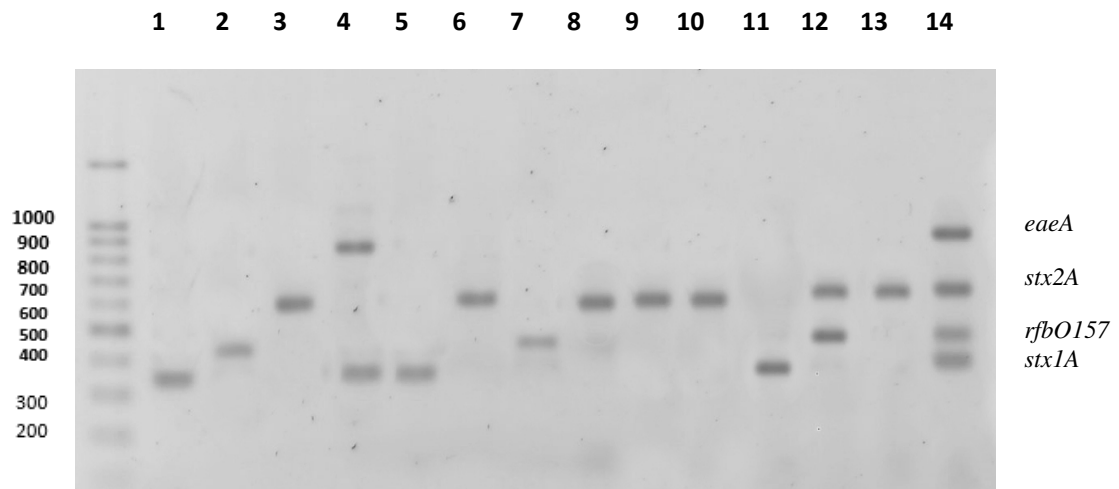


Figura 3. Gel agarosa del análisis del PCR múltiple de las cepas de *E. coli* presentes en canales de bovinos beneficiados en Lima. Cepas: 1 =44SI, 2= 34MFO, 3=299MFO, 4=322SII, 5=576SRFO, 6=315SRI, 7=268MFO, 8=134SRI, 9=315MI, 10=303MFO, 11=575SIFO, 12=298MFO, 13=42MI, 14=Control positivo (ATCC)

Cuadro 6. Caracterización mediante PCR múltiple de las cepas positivas de *E. coli* presentes en canales de bovinos beneficiados en Lima.

CEPA			CARACTERIZACIÓN DE STEC					
Código	Origen	Metodología	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>	<i>rfbO157</i>	<i>fliCH7</i>
34MFO	Oreo	MAC	-	-	-	-	+	-
42MI	Lavado	MAC	-	+	-	-	-	-
44SI	Lavado	SMAC	+	-	-	-	-	-
134SRI	Lavado	MAC	-	+	-	-	-	-
268MFO	Oreo	MAC	-	-	-	-	+	-
298MFO	Oreo	MAC	-	+	-	-	+	-
299MFO	Oreo	MAC	-	+	-	-	-	-
303MFO	Oreo	MAC	-	+	-	-	-	-
315SRI*	Lavado	MAC	-	+	-	-	-	-
315MI*	Lavado	MAC	-	+	-	-	-	-
322SII	Lavado	SMAC	+	-	+	-	-	-
575SIFO	Oreo	SMAC	+	-	-	-	-	-
576SRFO	Oreo	MAC	+	-	-	-	-	-

*Ambas cepas fueron obtenidas de la misma canal

+/- : presencia/ausencia del gen.

V. DISCUSIÓN

Este estudio detectó *E. coli* y STEC en 29.4% y 5.6% de las canales bovinas, respectivamente. Es claro notar que el porcentaje de la bacteria encontrada es relativamente alta tomando en cuenta que estas canales están listas para ser distribuidas hacia los puestos de ventas en mercados y tiendas; estos hallazgos evidencian el riesgo para la salud pública y pone de manifiesto la deficiencia en la aplicación de las buenas prácticas de manipulación en el matadero.

E. coli O157:H7 está presente en todo el mundo, pero muchos reportes en mataderos muestran una frecuencia bastante baja. Reyes-Rodríguez *et al.* (2013) determinaron 2.6% de *E. coli* O157:H7 en canales bovinas en México, similar a lo reportado previamente (2.7%) por Varela-Hernandez *et al.* (2007). Carney *et al.* (2006) determinaron 3% de *E. coli* O157 en canales bovinas en Irlanda. En Estados Unidos se encontró una prevalencia de 4.9% (Byrne *et al.*, 2003). En el presente estudio no se detectó cepas *E. coli* O157:H7, similar a lo reportado en un matadero evaluado en Colombia (Piedrahita, 2001), México (García *et al.*, 2009) e Irlanda (Madden *et al.*, 2001) mediante PCR. Esto puede reflejar la escasez o el bajo número de las bacterias que residen en los animales evaluados durante el periodo de muestreo (Masana *et al.*, 2010).

Las frecuencias de *E. coli* O157:H7 y STEC varían debido a la técnica de muestreo y al análisis utilizado. En el presente trabajo se usó el método no destructivo de hisopado durante el muestreo. Dorsa *et al.* (1997) concluyeron que la técnica de hisopado es muy eficaz para muestrear *E. coli* O157:H7 en canales en el matadero. Además Bolton *et al.* (2002) informaron que la técnica de

hisopado puede ser incluso más efectiva que la técnica de escisión, ya que muestrea un área mayor de muestreo en las canales bovinas.

En el presente análisis, el principal objetivo fue detectar *E. coli* O157:H7, por lo que está indicado el uso de la metodología SMAC. Sin embargo, se ha reportado que el agar SMAC no es generalmente útil para detectar cepas de STEC de otros serotipos distintos a O157:H7, pues no hay vinculación genética conocida entre la producción de Stx y fermentación de sorbitol.

Siendo de importancia para la salud pública el detectar otros serotipos de STEC, el presente estudio utilizó dos métodos microbiológicos, denominados MAC y SMAC, no existiendo concordancia entre la técnica usada y las muestras positivas a *E. coli* o STEC (Cuadro 4 y 5). En base a lo reportado, se concluye que es importante usar ambas metodologías, ya que i) no existió concordancia entre la presencia de STEC con una u otra metodología, y ii) el MAC detecta *E. coli* que pueden portar shigatoxinas con un serotipo diferente al O157:H7 y que son de interés en salud pública, mientras con el SMAC disminuimos esta posibilidad.

Se ha detectado STEC en canales de mataderos con frecuencias variables; se reportó 3.1% de STEC en canales bovinas analizadas por PCR múltiple en Chile (Pino, 2008), resultado similar (5.6%) a lo presentado en el presente estudio. Se ha reportado STEC O157 en canales bovinas en frecuencias que fluctúan entre 0.01% a 43.4% y de STEC no-O157 entre 1.7 a 58%. Las diferencias en estos resultados pueden explicarse por las diferencias en las metodologías, las zonas muestreadas en la canal (es posible que a una mayor área de muestreo hay una mayor probabilidad de detección de *E. coli*) y también las medidas de control empleadas en cada camal (Gill y Jones, 2000).

Hussein (2007) detectó STEC O157 en el 0.7% de las canales bovinas de un matadero en EEUU, resultados similares a los de Guyon *et al.* (2001) que detectó 0.2% en Francia y Reyes-Rodríguez *et al.* (2013) 0.8% en México. McEvoy *et al.* (2003) reportó 3.2% en Irlanda y Carney *et al.* (2006) describió 3% en el mismo país, Bonardi *et al.* (2001) 12% en Italia y Masana *et al.* (2010) 2.6% en Argentina. En el presente estudio, una cepa procedente de una canal, 1/180 (0.56%), resultó

STEC O157, positivo al gen *rfbO157* y al gen *stx2*. Los reportes de *E. coli* O157 con genes *stx2* son a menudo asociados con la enfermedad SHU (Werber *et al.*, 2003).

En el presente estudio se encontró 10 cepas procedente de 9 canales (5%) que fueron STEC no O157, similar a lo descrito por Terrance *et al.* (2002) que detectaron 8.3% de STEC no O157 en EEUU. Las cepas STEC no O157 están asociadas con cuadros de diarrea y enterocolitis y la mayoría de estos tiene como reservorio principal a los bovinos. Estas cepas también están frecuentemente implicadas en casos de SHU (Rivas *et al.*, 2006).

Asimismo, estas cepas STEC no O157 podrían contaminar posteriormente la cadena cárnica, y llegar a la carne expandida en cortes, picada y molida. En EEUU, 7.3% de las muestras de carne molida fueron positivas para STEC no O157 (Bosilevac y Koohmaraie, 2011). Acheson (2000) determinó 15.6% de carne picada en EEUU. Cardozo *et al.* (2012) reportó un 4.3% en productos cárnicos en Venezuela. Baeza (2014) determinó 6.6% (20/304) de STEC, positivos a *stx1*, *stx2* y gen *eaeA* en muestras de carne en Chile. Jure *et al.* (2010) determinaron 13.2% (7/53) de STEC no O157 en muestras de carne molida analizadas en Argentina.

El presente trabajo evidencia que cepas de STEC productor de toxina Shiga Stx1 y Stx2, están circulando en canales bovinas en nuestro medio; esto implica la posibilidad de una magnificación del agente posteriormente durante su distribución y expendio (FAO y OMS, 2004). Etcheverría *et al.* (2010) determinó un 12.34% y el 18.64% de canales STEC positivas en centros de matanzas y cabina de control sanitario (oficina donde las canales llegan desde centros de beneficios ubicados fuera de la ciudad y de allí se entregan a las carnicerías), respectivamente. Posteriormente la frecuencia aumentó a 25% de canales STEC positivas en las carnicerías (puntos de venta). Por tanto, es muy probable que ocurra un aumento en la frecuencia de canales STEC positivas durante el transporte desde el centro de matanza hacia el punto de venta.

Dentro de los factores de virulencia, la toxina Shiga es considerado el factor de virulencia crítico en las enfermedades producidas por STEC. En el presente trabajo se determinó que 10.1% (7/69) de las cepas de *E. coli* presentaron el gen *stx2* y 4.4% (3/69) presentaron el gen *stx1*. Diversos

reportes señalan que el *stx2* fue el gen predominante sobre *stx1*, en diferentes niveles de la cadena de comercialización de la carne (Blanco *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2009). La proteína codificada por el gen *stx2* es aproximadamente 1000 veces más tóxica para las células endoteliales microvasculares renales de los humanos que la *stx1* (Louise y Obrig, 1995).

El mayor porcentaje de *stx2* es un hallazgo a tener en cuenta puesto que existe evidencia de la asociación de *Stx2* con un mayor riesgo de desarrollar SUH (Boerlin *et al.*, 1999; Ethelberg *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha descrito que la presencia en asociación de los genes *eaeA* y *stx2*, resulta frecuentemente en una mayor severidad de la enfermedad (Persson *et al.*, 2007). Si bien en el presente trabajo no se detectó esta asociación, una cepa resultó positiva al gen *stx1* y *eaeA*, siendo también patógena por la presencia del gen de la intimina, la cual facilita la unión de la bacteria a la membrana intestinal.

La mayoría de las cepas de STEC detectadas en el presente estudio fueron *eaeA* negativos, agentes que también atentan contra la salud pública (Paton y Paton, 1998; Gyles, 2007). Donnenberg *et al.* (1993) demostraron que STEC *eaeA* negativos son capaces de adherirse normalmente a los enterocitos activando los receptores de tirosina quinasa celular, sugiriendo que la unión intimina no es esencial para el desarrollo de la diarrea por STEC.

En el presente estudio se detectó 2 cepas *E. coli* O157, procedentes de dos canales (1.1%) y negativas a los demás factores de virulencia. La presencia de *E. coli* O157 en canales del ganado durante el beneficio pueden variar ampliamente, desde 4.5% (Barham *et al.*, 2002) a 56% (Tutenel *et al.*, 2003). En México se detectó 5% de *E. coli* O157 *stx* negativos en canales bovinas de las plantas de beneficio (Varela-Hernández *et al.*, 2007) y en Turquía se reportó 0.4% de *E. coli* O157 en canales bovinas (Ayaz *et al.*, 2014).

Schmidt *et al.* (1999) y Allerberger *et al.* (2000) demostraron que las cepas de *E. coli* O157 no requieren de los genes *stx* para causar enfermedad grave. *E. coli* O157 *stx* negativas se han reportado estar presentes en pacientes con SHU y diarrea (Karch y Bielaszewska, 2001). En el Perú se

menciona la presencia de cepas de *E. coli* O157 no H7 que provenían de heces personas afectadas y que carecían de factores de virulencia (Huguet *et al.*, 2002).

Thomas *et al.* (2012) reportaron cepas de *E. coli* O157 negativas a factores de virulencia por PCR múltiple, que al inicio del estudio fueron positivas a Stx1 y/o Stx2 y que perdieron estos factores de virulencia durante el cultivo y sub cultivo para el PCR. Asimismo, Karch y Bielaszewska (2001) y Barkocy-Gallagher *et al.* (2004) coinciden que las cepas *E. coli* O157 negativas a factores de virulencia pudieron perder los genes shigatoxinas debido a los constantes cultivos y congelación. Similar situación pudo ocurrir con las cepas *E. coli* O157 detectadas en la presente investigación, pues una vez identificadas las cepas de *E. coli* mediante microbiología convencional, estas se guardaron en frío y posteriormente se resembraron y cultivaron para su evaluación en conjunto por PCR múltiple.

En el presente estudio no se encontró diferencia significativa entre ambos momentos del muestreo, *E. coli* fue detectada en un 34.4% (31/90) en el momento denominado LAVADO y 24.4% (22/90) en el momento denominado OREO ($p>0.05$). Este resultado nos indica que la probabilidad de contaminarse con este agente patógeno existe durante todo el proceso, lo que principalmente se explicaría en la deficiencia de buenas prácticas.

En la zona de oreo ocurre un rápido enfriamiento de las canales y disminución de PH, que podría restringir la proliferación de patógenos y controlar mínimamente su presencia (ICMSF, 1996; OMS, 2011). No obstante en los mataderos evaluados no se apreció un control adecuado en la zona de oreo, pudiendo estar en una misma área, comerciantes, matarifes y personas no autorizadas, los cuales también podrían contaminar las canales al manipularlas directamente. En todo momento se observó a estas personas sin la indumentaria correcta para estar en la playa de oreo. Este problema se repite frecuentemente en los mataderos de Lima, lo que en parte explica la detección de agentes patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en canales en oreo (Salvatierra, 2014 y Barrientos *et al.*, 2015).

Durante la etapa de muestreo del presente trabajo se detectó que los matarifes no realizaban las buenas prácticas requeridas. Se observó que los matarifes trabajaban sin indumentaria adecuada, en

algunas oportunidades se desplazaban desde zonas sucias (desolle o eviscerado) hacia zonas limpias (lavado); también se observó una ducha incorrecta de los animales al inicio del faenamiento, la falta de lavado exhaustivo de las canales, el incorrecto desprendimiento de las vísceras y la falta de una desinfección continua de los utensilios usados. Esta situación ha sido previamente descrita por Barrientos *et al.* (2015). Todo esto puede explicar las frecuencias de *E. coli* y STEC obtenidas en el presente análisis.

Existe una correlación entre la presencia de STEC en heces y piel, y la presencia de STEC en la canal (Elder *et al.*, 2000). El mayor riesgo de contaminación ocurre durante el proceso de faena, cuando el contenido intestinal puede tener contacto con la superficie de la canal (Edwards y Fung, 2006; Arthur *et al.*, 2010).

Asimismo, la piel de ganado vacuno representa una especial preocupación de seguridad alimentaria. Por la naturaleza del proceso de eliminación de la piel, puede que sea difícil evitar la transferencia de bacterias patógenas hacia la canal (Barkocy-Gallagher *et al.*, 2003; Baird *et al.*, 2006). Jacob *et al.* (2010) demostraron que una canal tiene 5.5 veces más probabilidad de estar contaminada con *E. coli*, si la piel es *E. coli* positivo. Esto concuerda con lo descrito por Brichta-Harhay *et al.* (2008), que señala que la piel es una fuente importante de contaminación de la canal.

También debe considerarse la contaminación por fuentes externas como el aire, el suelo, agua, utensilios no lavados adecuadamente; así como la contaminación cruzada por los manipuladores de la canal, que en suma contribuye a la contaminación microbiana de la carne (Umoh, 2001). Otro factor que podrían influir en la variabilidad de las frecuencias de *E. coli* y STEC en mataderos, es la época del año del muestreo. Se ha demostrado que STEC se excreta a mayor frecuencia en los meses más cálidos, y con una frecuencia menor durante los meses fríos (Gyles, 2007), coincidiendo con nuestro muestreo que se realizó durante los meses de verano.

La identificación de los factores de virulencia presentes en las cepas *E. coli* aisladas mediante ambas metodologías se realizó mediante la técnica de PCR múltiple descrita por Mori (2013). La técnica de PCR ha sido la más útil y precisa para determinar *E. coli* O157:H7 y STEC (Paton y Paton,

1998; Klerks *et al.*, 2004). Los cebadores empleados en el presente análisis permiten evitar reacciones cruzadas con otras especies de *E. coli*, otros serotipos O de *E. coli* u otras bacterias, según lo reportado previamente (Fratamico *et al.*, 1995).

La carne es el principal vehículo de toxiinfecciones alimentarias, como consecuencia de una higiene deficiente en el sacrificio de los animales o durante el manejo de las canales. El bovino es el mayor reservorio de la bacteria a nivel mundial, y la carne picada o molida insuficientemente cocida contaminada con STEC es considerada como la fuente más frecuente de los brotes de colitis hemorrágica y de síndrome urémico hemolítico (Mead y Griffin, 1998). El comercio de carne de bovino contaminada con esta bacteria en nuestro país es un potencial riesgo para la Salud Pública, tomando en cuenta que es la tercera carne más consumida en el Perú (MINAG, 2011), y que una característica particular de STEC es la dosis infectiva baja, menor a 100 células, por lo que mínimas exposiciones pueden resultar en infección (Cheleste, 2004).

El escenario más común que conduce a la enfermedad, ha implicado la cocción insuficiente, y la contaminación cruzada en cocinas y establecimientos de alimentos de carne bovina a otros alimentos listos para el consumo (CCFH, 2005).

En el Perú no existen muchos estudios que determinen la presencia de esta bacteria y su relación con SHU. Contrariamente, en Argentina el SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños, la segunda causa de falla renal crónica y representa la causa del 20% de los trasplantes renales de adolescentes y niños (Rivas *et al.*, 2006). En nuestro país se ha reportado STEC en niños que tenían diarrea, detectando frecuencias desde 0.4% hasta 9.2% de casos reportados (Contreras *et al.*, 2011; Ochoa *et al.*, 2011; Llanos *et al.*, 2012).

En nuestro estudio no se detectó el serotipo *E. coli* O157: H7 en las canales bovinas, empero se encontró STEC, STEC O157, *E. coli* O157 que también son de importancia clínica y como ya se ha mencionado puede provocar problemas muy serios para el ser humano. Por lo tanto, nuestros hallazgos suman, junto con otros estudios (Zambrano *et al.*, 2013; Lucas, 2014; Barrientos *et al.*, 2015), al

llamado de atención a nuestras autoridades para que fortalezcan las medidas de control de las buenas prácticas en los mataderos en Lima.

STEC y *E. coli* O157:H7 ha desencadenado innovaciones tecnológicas, algunas en uso, muchas en desarrollo y otras por desarrollarse, con el fin de resolver el conflicto de su presencia sobre las canales y luego como consecuencia, en las carnes picadas o molidas. Entre las estrategias de intervención para reducir esta bacteria se han ensayado diversos métodos como la aspiración con vacío y vaporizador, el pasteurizador con vapor o con agua caliente y los ácidos orgánicos, entre otros (Michanie, 2003).

Sería importante aplicar un programa de vigilancia epidemiológica que permita detectar oportunamente la presencia de cepas de STEC en carne de bovinos con la finalidad de evitar la diseminación de dichas cepas cuya presencia es frecuente en el mundo e inclusive en países de América del Sur, y que en un futuro cercano podrían constituir un problema importante de salud en el Perú. Asimismo, la presencia de STEC enfatiza la importancia de implementar rigurosamente programas de control con HACCP, así como evaluar y validar intervenciones antimicrobianas que reduzcan la presencia de microorganismos patógenos.

En nuestra realidad la aplicación de tratamientos en canales bovinas con ácidos orgánicos o desinfectantes naturales podría ser una solución a corto plazo. Lucas (2014) utilizaron ácido láctico 2.5% para tratar las canales de bovinos. Valencia *et al.* (2003) que señalaron al kilol (producto natural orgánico extraído de la semilla de toronja) como el tratamiento más eficaz en carne y canal de bovinos durante el beneficio.

Se recomienda profundizar estudios futuros sobre otros genes asociados a la patogénesis de las cepas STEC, dado que la heterogeneidad genética entre los subtipos y factores de virulencia, pueden generar diferencias en la patogenicidad de diferentes poblaciones de STEC en humanos.

VI. CONCLUSIONES

- No se detectó *E. coli* O157:H7 en canales bovinas de los camales muestreado de Lima metropolitana.
- Las cepas de *E. coli* que se aislaron fueron STEC en el 5.6% de las canales, *E. coli* O157 en el 1.1% y STEC O157 en el 0.5%.

VII. LITERATURA CITADA

1. Acheson DWK. 2000. How does *Escherichia coli* O157:H7 testing in meat compare with what we are seeing clinically? J Food Prot. 63(6): 819–821.
2. Alexandre LL, Bernard PD, Jacques M. 2000. Particular biochemical profiles for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates on the ID 32E system. J Clin Microbiol. 39(3): 1161–1164.
3. Alfaro L y Santana L. 2003. Prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne de vacuno, queso fresco y verduras expendidos en los mercados de Lima Metropolitana y condiciones higiénico sanitarias asociadas a su ocurrencia. Tesis para optar el grado de Magíster en Salud Pública. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
4. Allerberger F, Dierich MP, Gruber-Moesenbacher U, Liesegang A, Prager R, Hartmann G, Rabsch W, Tschape H, Karch H. 2000. Nontoxigenic sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H2 associated with a family outbreak of diarrhoea. Wien. Klin. Wochenschr 112(19):846–850.
5. Ansay SE, Darling KA, Kaspar CW. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef patties during storage at 2, -2, 15 and then -2 degrees C, and -20 degrees C. J Food Prot. 62(11): 1243-1247.
6. Arthur TM, Bosilevac JM, Kalchayanad N, Wells JE, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2010. Evaluation of a direct fed microbial product effect on the prevalence and load of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. J. Food Prot. 73(2): 366–371
7. Ayaz ND, Gencay YE, Erol I. 2014. Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157:H7+/H- isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater. Int J Food Microbiol. 174: 31-38.
8. Baeza C. 2014. Aislamiento y caracterización de cepas de *Escherichia Coli* productor de Shigatoxina desde carne de vacuno nacional e importada distribuida en los principales supermercados de la Provincia de Santiago. Red Chilena de instituciones formadoras en Salud Pública. Tesis de Medicina veterinaria. Santiago: Universidad Mayor. 77 p.
9. Baird NJ, Srividya N, Krasilnikov AS, Mondragon A, Sosnick TR, Pan T. 2006. Structural basis for altering the stability of homologous RNAs from a mesophilic and a thermophilic bacterium. RNA 12(4): 598–606.

10. Barham AR, Barham BL, Johnson AK, Allen DM, Blanton JR, Miller MF. 2002. Effects on the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. J Food Prot.65(2): 280–283.
11. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2003. Seasonal prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. J Food Prot. 66(11): 1978-1986.
12. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, Nou X, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2004. Characterization of O157 and other *Escherichia coli* isolates recovered from cattle hides, feces, and carcasses. J food prot. 67(5): 993-998.
13. Barrientos E, Lucas R, Ramos D, Rebatta M, Arbaiza T. 2015. Presencia de *Listeria monocytogenes* en canales porcinas de Lima, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 26(1): 135-139
14. Bentancor A, Agostini A, Rumi MV, De Gregorio OJ. 2006. Factores de riesgo de infección por cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénicas en gatos y perros. En: I Congreso Panamericano de Zoonosis y XII Jornadas Argentinas de Microbiología.
15. Beutin L. 1999. *Escherichia coli* O157 and other types of verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) isolated from humans, animals and food in Germany, p. 121-145. In C. S. Stewart and H. J. Flint (ed.), *Escherichia coli* O157 in farm animals. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.
16. Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. 2004. Characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3- year period. J Clin Microbiol. 42(3): 1099-1108.
17. Bindu Ch y Krishnaiah N. 2010. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in foods of animal origin by cultural methods and PCR technique. Veterinary World 3(1): 13-16.
18. Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Bernardez G, Blanco J. 2004. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin) producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae- χ). J Clin Microbiol. 42(2): 645-651.
19. Blanco J y Blanco M. 1993. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino: patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. Lugo: Edita 361 p.
20. Blanco M, Lazo L, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C. 2006. Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. Int Microbiol. 9(1):53-60.

21. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. 1999. Associations between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J Clin Microbiol. 37(3): 497-503.
22. Bolton DJ, Pearce RA, Sheridan JJ, Blair IS, McDowell DA, Harrington D. 2002. Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) systems. J Appl Microbiol. 92(5): 893-902.
23. Bonardi S, Maggi E, Pizzin G, Morabito S, Caprioli A. 2001. Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. International Journal of Food Microbiology 66(1): 47-53.
24. Boschi-Pinto C, Velebit L, Shibuya K. 2008. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. Bull World Health Organ. 86(9):710-717.
25. Bosilevac JM y Koohmaraie. 2011. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. Appl Environ Microbiol. 77(6): 2103-2112
26. Bravo VGB y Villalobos de B. LB 2002. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 22(2): 119-121
27. Brichta-Harhay DM, Guerini MN, Terrance MA, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. 2008. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 Contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: an evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. Appl Environ Microbiol. 74(20): 6289-6297.
28. Byrne CM, Erol I, Call JE, Kaspar CW, Buege DR, Hiemke CJ. 2003. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from Downer and Healthy Dairy Cattle in the Upper Midwest Region of the United States. Appl Environ Microbiol. 69(8):4683-4688.
29. Calderwood SB, Acheson DWK, Keusch GT, Barrett TJ, Griffin PM, Strockbine NA. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News. 62:118-119.
30. Cardozo L, Martínez RE, Feng P, Villalobos LB. 2012. Primer aislamiento de *Escherichia coli* no O157 productor de toxina Shiga en carnes bovina y porcina en Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 32(2): 107-111.
31. Carney E, O' Brien SB, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS, Duffy G. 2006. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. Food Microbiol. 23(1): 52-9
32. Casellas JM. 2011. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: Consecuencias para la infectología. Rev. Panam. Salud Pública 30(6): 519-528.
33. (CCFH) Codex Committee on Food Hygiene 2005. Discussion paper on guidelines for the application of general principles of food hygiene to the risk based control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef and fermented sausages.

34. (CDCP) *Centers for Disease Control and Prevention*. 2012. Guidance for public health laboratories on the isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from clinical specimens. Atlanta: Editorial Association of Public Health Laboratories.
35. (CDCP) *Centers for Disease Control and Prevention*. 2009. Recommendations for Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections by Clinical Laboratories. Atlanta: Editorial Association of Public Health Laboratories. 20 p.
36. (CFSPH) *Center for food security and public health*. 2010. Enfermedades emergentes y exóticas de los animales. 1era edición. Iowa state university. p 119-122.
37. Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ. 1993. Cattle as a possible source of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol Infect.* 111(3): 439-447.
38. Cherla RP, Lee SY, Tesh VL. 2003. Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett.* 228(2): 159-166.
39. Cheleste M. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis.* 38(9): 1298-1303.
40. Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J. Food Prot.* 64(9):1346-1351.
41. Chinen I, Otero JL, Miliwebsky ES, Roldan ML, Baschkier A, Chillemi GM, Noboli C, Frizzo L, Rivas M. 2003. Isolation and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. *Research in Veterinary Science* 74(3): 283-286.
42. Clavero MRS y Beuchat LR. 1995. Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl Environ Microbiol.* 61(9):3268-3273.
43. Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Marild S, Svanborg C. 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(18): 9827-9832.
44. Contreras CA, Ochoa TJ, Ruiz J, Lacher DW, Rivera FP, Saenz Y, Chea-Woo E, Zavaleta N, Gil AI, Lanata CF, Huicho L, Maves RC, Torres C, Debroy C, Cleary TG. 2011. Phylogenetic relationships of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Peruvian children. *J Med Microbiol.* 60(5): 639-646.
45. Copes J, Pellicer K, Del Hoyo G. 2009. Primer aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de hamburguesas en Paraguay. *Analecta Veterinaria* 29(1): 11-14.
46. Croxen MA y Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8(1): 26-38.
47. Daniel D. 1996. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 5° ed. México DF: Trillas. 78 p.

48. *Donnenberg MS, Tzipori M, Mc Kee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB. 1993. The role of the eae gene of enterohaemorrhagic E. coli in intimate attachment in vitro and in a porcine model. J Clin Invest. 92(3): 1418-1424.*
49. *Donnenberg MS y Whittam TS. 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. J Clin Invest. 107 (5): 539-548.*
50. *Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, Economou V, Apostolou I, Zakkas G. 2003. Isolation of Escherichia coli O157:H7 from foods in Greece. Int J Microbiol. 82(3): 273-279.*
51. *Dorsa WJ, Siragusa GR, Cutter CN, Berry ED, Koohmaraie M. 1997. Efficacy of using a sponge sampling method to recover low levels of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium and aerobic bacteria from beef carcass surface tissue. Food Microbiology 14: 63-69*
52. *Duffy G, Cummins E, Nally P, O'Brien S, Butler F. 2006. A review of quantitative microbial risk assessment in the management of Escherichia coli O157:H7 on beef. Meat Science 74(1): 76-88.*
53. *Edwards JR y Fung DYC. 2006. Prevention and decontamination of Escherichia coli O157:H7 on raw beef carcasses in commercial beef abattoirs. J. Rapid Methods Autom. Microbiol. 14(1): 1-95.*
54. *EFSA/ECDC. 2011. European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control. The European Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2009. The EFSA Journal 9(3): 2090.*
55. *Elder RO, Keen JE, Siragusa GR. 2000. Correlation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. Proc Natl Acad Sci 97(7): 2999-3003.*
56. *Etcheverría AI, Padola NL, Sanz ME, Polifroni R, Krüger A, Passucci J, Rodríguez EM, Taraborelli AL, Ballerio M, Parma AE. 2010. Occurrence of Shiga toxin-producing E. coli (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. Meat Sci. 86(2): 418-421.*
57. *Ethelberg S, Olsen KE, Scheutz F, Jensen C, Schiellerup P, Enberg J, Petersen AM, Olesen B, Gerner-Smidt P, Mølbak K. 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. Emerg Infect Dis. 10(5):842-847.*
58. *(FAO) Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación y (OMS). Organización mundial de la salud 2004. Documento de debate sobre el perfil de*

- riesgos para *Escherichia coli* enterohemorrágica, incluida la identificación de los productos básicos de interés, entre ellos las semillas germinadas y la carne molida de res y puerco. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del codex sobre higiene de los alimentos. trigésima sexta reunión. Washington DC, Estados Unidos de América.
59. Feng P. 2000. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerg. Infect. Dis.* 1(2): 47-52.
 60. Feng P y Weagant SD. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 4a. U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S.A.
 61. Fernández D, Rodríguez EM, Arroyo GH, Padola NL, Parma AE. 2009. Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (*stx*) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *J Appl Microbiol.* 106(4): 1260–1267.
 62. Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L. 2005. Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures. *Journal of Basic Microbiology* 45(5): 403-404.
 63. Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 33(8): 2188-2191.
 64. Frenzen PD, Drake A, Angulo FJ. 2005. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. *J Food Prot.* 68(12): 2623-2630.
 65. Friedrich AW, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschäpe H, Karch H. 2003. Shiga toxin 1c producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J Clin Microbiol.* 41(6): 2448-2453.
 66. Gannon V, De Souza S, Graham T, King R, Rahn K, Read S. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin. Microbiol.* 35(3): 655-662
 67. García E, Rubio M, Alonso RA, Gayosso A, Miranda SP, Nicoli M, Núñez JF. 2009. Amplificación múltiple de ADN para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp.en canales de bovino. *CyTA-Journal of food* 7(1): 31-36
 68. Gill CO y Jones T. 2000. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *J Food Prot.* 63(2): 167–173.
 69. Gill CO y Landers C. 2004. Proximate sources of bacteria on boneless loins prepared from routinely processed and detained carcasses at a pork packing plant. *Intern J Food Microbiol.* 97(2): 171-178.
 70. Griffin PM y Tauxe RV. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev.* 13:60-98.

71. Griffin PM. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. En: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, editors. Infections of the gastrointestinal tract. New York, Raven Press, Ltd. p 739-761.
72. Guessous F, Marcinkiewicz M, Polanowska-Grabowska R, Keepers TR, Obrig T, Gear AR. 2005. Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide cause monocytic THP-1 cells to release factors which activate platelet function. *Thromb Haemost.* 94(5):1019-1027.
73. Guyon R, Dorey F, Malas JP, Grimont F, Foret J, Rouvière B, Collobert JF. 2001. Superficial contamination of bovine carcasses by *Escherichia coli* O157:H7 in a slaughterhouse in Normandy (France). *Meat Science* 58(3): 329–331.
74. Gyles CL. 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Science*, 85(13 Suppl.): E45–E62.
75. Gyles CL. 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol.* 38(7): 734-746.
76. Hammermueller J, Kruth S, Prescott J, Gyles C. 1995. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Canadian Journal of Veterinary Research* 59(4): 265-70.
77. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JT, Beumen BR, Boer E. 1999. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meat obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot.* 62(10): 1115-1122.
78. Hornitzky MA, Mercieca K, Bettelheim KA, Djordjevic SP. 2005. Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and shiga toxin-producing *E. coli* strains that commonly possess intimin. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7): 3405-3412.
79. Huapaya B, Huguet J, Suárez V, Torres de Yón Y, Montoya Y, Salazar-Lindo E, Sakuray S, Tejada C, Gambirazio C, Gómez J. 2001. Primer Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. *Rev Med Exp*; 18 (1-2): 38-39.
80. Huapaya B, Zamudio M, Arias I, Suárez V, Huguet J, Salazar E. 2005. Etiología de la diarrea con sangre en poblaciones de zonas de riesgo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y otras *E. Coli* Shigatoxina (STEC). Lima: MINSA. Serie Informes Técnicos N°85.
81. Huguet J, Huapaya B, Salazar-Lindo E. 2002. Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 19(2): 63-67.

82. Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW. 2001. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect. Immun.* 69(10): 6148-6155.
83. Hussein HS y Bollinger LM. 2005. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *J Food Prot.* 68(10): 2224-2241.
84. Hussein HS. 2007. Prevalence and pathogenicity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci.* 85 (13 Suppl.): E63-E72.
85. (ICMSF) *International Commission on Microbiological Specifications for Foods.* 1996. Intestinally pathogenic *Escherichia coli*. In *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of microbial pathogens*, Gaythersburg, MD: Aspen Publishers, Inc. p 126-140.
86. (INS) *Instituto Nacional de Salud.* 2005. Etiología de la diarrea con sangre en poblaciones de zonas de riesgo *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) y otras *E. coli* shigatoxina (STEC). Ministerio de Salud. Centro de información y documentación científica. Serie informes técnicos n°85. 13 p.
87. (INEI) *Instituto Nacional de Estadística e Informática.* 2012. Resultados definitivos del cuarto censo nacional agropecuario 2012. Serie de informes técnicos 62 p.
88. Jacob ME, Renter DG, Nagaraja TG. 2010. Animal- and truckload-level associations between *Escherichia coli* O157:H7 in feces and on hides at harvest and contamination of previsceration beef carcasses. *J Food Prot* 73(6): 1030–1037.
89. Johnson RP, Clarke RC, Wilson JB, Read SC, Rahn K, Renwick SA. 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot.* 59(10):1112-1122.
90. Johnson JR. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 1991 Jan; 4(1): 80–128.
91. Johannessen GS, Bengtsson GB, Heier BT, Bredholt S, Wasteson Y, Rorvik LM. 2005. Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 71(5): 2221-2225.
92. Jure MA, Condori S, Leotta GA, Chinen I, Miliwebsky E, Allori, De Castillo MC. 2010. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. *Rev Argent Microbiol.* 42(4) 284-287.
93. Just JR y Daeschel MA. 2003. Antimicrobial effects of wine on *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in a model stomach system. *Journal of Food Science* 68(1): 285–290.
94. Karch H, Heesemann J, Laufs R, O'Brien AD, Tacket CO, Levine MM. 1987. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun.* 55(2): 455-461.

95. Karch H y Bielaszewska M. 2001. Sorbitol-Fermenting Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157: H- Strains: Epidemiology, Phenotypic and Molecular Characteristics and Microbiological Diagnosis. J Clin Microbiol. 39(6): 2043–2049
96. Karmali MA. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2(1):15-38.
97. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol. 41(11): 4930-4940
98. Klerks MM, Zijlstra C, Van Bruggen AHC. 2004. Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella* entérica and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control. J. Microbiol. Methods 59(3): 337-349.
99. Koneman. 2006. Diagnóstico Microbiológico texto en atlas y color. 6ta edición. España: Editorial médica panamericana. 1696 p.
100. Konowalchuk J, Speirs JJ, Stavric S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 18(3): 775-779.
101. Koster M, Bitter W, Tommassen J. 2000. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. Int J Med Microbiol. 290(4-5):325-331.
102. Lee VT y Schneewind O. 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. Genes and Develop 15:1725-1752.
103. Leotta GA, Deza N, Origlia J, Martinez E, Chinen I, Miliwebsky E, Manfredi E, Baschier A, Rivas M. 2004. Frecuencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en mamíferos silvestres cautivos. En: XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología. X Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología.
104. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M. 2005. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev Argent. Microbiol. 37(1): 1-10
105. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. 2010. Review: A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. J Microbiol Biotechnol. 20(1): 5-14
106. Lindbland M. 2007. Microbiological sampling of swine carcasses: a comparison of data obtained by swabbing with medical gauze and data collected routinely by excision of Sweden abattoirs. International Journal of Food Microbiology 118(2): 180-185.

107. Llanos A, Lee J, López F, Contreras C, Barletta F, Chea-Woo E, Ugarte C, Cleary TG, Ochoa TJ. 2012. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Peruvian children with bloody diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 31(3): 314-316.
108. Louise CB y Obrig TG. 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis.* 172(5): 1397–1401.
109. Lucas JR. 2014. Efecto de la aplicación de ácidos orgánicos sobre *Listeria monocitogenes* en canales bovinas de un matadero de Lima-Perú. En XXIV. La Habana: Congreso Panamericano Ciencias Veterinarias.
110. McEvoy JM, Doherty AM, Sheridan JJ, Thomson-Carter FM, Garvey P, McGuire L, Blair IS, McDowell DA. 2003. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *J Appl Microbiol.* 95(2): 256–266.
111. Madden RH, Espie WE, Moran Lynn, McBride J, Scates. 2001. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter spp* on beef carcasses in Northern Ireland. *Meat Science* 58(4): 343-346.
112. Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari C, Rodríguez HR, Rivas M. 2010. Prevalence, Characterization, and Genotypic Analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *Journal of food Protection* 73(4): 649-656.
113. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*. Elsevier Ltd. Second edition. p 239-274.
114. Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, Sanchez S, Bolton L, Lee MD. 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65(7): 2954-2960.
115. Mazorca MA, Marucci PL, Sica MG, Álvarez EE. 2006. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología* 38(1): 38-40
116. Mead PS y Griffin PM. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352: 1207-1212.
117. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré, A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BEC, Masana MO, Cataldi A, Rodríguez HR, Rivas M. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol.* 96(2): 189-198.
118. Méndez-Álvarez S y Pérez-Roth E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(3):183-192.
119. Méndez CR, Vergaray G, Morante HY, Flores PR, Gamboa RA. 2013. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de carne molida de bovino en Lima-Perú. *Rev Perú Biol.* 20(2):159-164.

120. Méndez-Farro CR, Vergaray-Ulffe G, Ochoa TJ. 2009. *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en carne de bovino que se comercializa en Lima. En: X Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos X COLMIC.
121. Meng J, Feng P, Doyle MP. 2001. Pathogenic *Escherichia coli* in: Downes FP and Ito K. (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition. American Public Health Association, Washington. D.C
122. Mercado EC, Rodríguez SM, Elizondo AM, Marcoppido G, Parreño V. 2004. Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia Coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. J Clin Microbiol. 42(10): 4809-4811.
123. Michanie S. 2003. *Escherichia coli* O157:H7, la bacteria que dispara el HACCP en la industria de la carne. Rev. Ganado y carne. 4(17): 40-42.
124. (MINAG) Ministerio de Agricultura 2011. Producción pecuaria e industria avícola 2010. Oficina de Información agraria. [Internet], [5 febrero 2014]. Disponible en: [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/659B60D9CC174973052579800078A4F7/\\$FILE/2010-PRODUCCION-PECUARIA.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/659B60D9CC174973052579800078A4F7/$FILE/2010-PRODUCCION-PECUARIA.pdf)
125. (MINAG) Ministerio de Agricultura 2013. Situación de las actividades de crianza y producción. [Internet], [14 noviembre 2014]. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/pecuaria/situación de las actividades de crianza y producción>
126. (MSAN) Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. 2005. Diarrea aguda en Argentina. Precauciones especiales durante el período de verano. Epi-Noticias, Año IV, Número 527. 3 p.
127. Miyamoto Y, Imura M, Kaper JB, Torres AG, Kagnoff MF. 2006. Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium in vivo. Cell. Microbiol. 8(5): 869-879.
128. Mora A, M. Blanco JE, Blanco M. 2003. Prevalencia, serotipos y genes de Virulencia de los *Escherichia coli* verotoxigénicos (O157 y no O157) en el ganado y carne de bovino. Rev. Epidem Med Prev 1: 34-36.
129. Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, López C, Justel P, Alonso MP, Echeita A, Bernárdez MI, González EA, Blanco J. 2007. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. BMC Microbiol. 7:13.
130. Moreno B. 1991. Higiene e inspección de carnes. Volumen I. Graficas Celarayn, S.A. España. 437 p.
131. Mori L. 2013. Molecular Identification of Shiga-Toxin Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in Diarrheic and Healthy Young Alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.

132. Müller D, Hagedorn P, Brast S, Heussipp G, Bielaszewska M, Friedrich A. 2006. Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology* 44(7): 2626-2629.
133. Nagano I, Kunishima M, Itoh Y, Wu Z, Takahashi Y. 1998. Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.* 42(5): 371-376.
134. Nataro JP y Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11(1):142–201.
135. Naylor SW, Low C, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, Pearce MC, McKendrick IJ, Smith DGE, Gally D. 2003. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infect Immun.* 71(3): 1505-1512.
136. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases* 146(6): 763–769.
137. Ochoa T, Mercado E, Durand D, Rivera F, Mosquito S, Contreras C, Riveros M, Lluque A, Barletta F. 2011. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 28(1): 13-20.
138. Okrend AJ, Rose GBE, Bennett B. 1990. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot.* 53:194–274.
139. (OMS) Organización Panamericana de la Salud 1997. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 16 ed., Washington DC: OPS
140. (OMS) Organización Mundial de la Salud. 2011. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Informe técnico. Nota descriptiva N°125
141. Palermo M, Alves RF, van Rooijen N, Isturiz MA. 1999. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clin Exp Immunol.* 116(3): 462-467.
142. Pascual R. 2005. Enfermedades de origen alimentario, su prevención. Ediciones Díaz de Santos, S.A. 208 p.
143. Paton AW y Paton JC. 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111 and rfbO157. *J Clin Microbiol.* 36(2): 598-602.

144. Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F. 2007. Subtyping methods for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlation to clinical manifestations. J Clin Microbiol. 45(6): 2020-2024.
145. Phaswana-Mafuya N. 2006. Health aspects of sanitation among Eastern Cape (EC) rural communities, South Africa. Curationis 29(2): 41-47.
146. Piedrahita D, Márquez T, Mattar S. 2001. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos en el Departamento de Córdoba. MVZ-Córdoba. 6(2): 119-126.
147. Pino M. 2008. Detección e identificación de *Escherichia coli* verotoxigenica serotipo O157 y no O157 utilizando una reacción de inmunoensayo tipo sándwich y PCR múltiple en muestras de heces y canales bovinas.
148. Prescott J, Harley D, Klein A. 1999. Microbiología. 4ta edición. España: Mc Graw-Hill Interamericana. 1240 p.
149. Proulx F, Seidman E G, Karpman D. 2001. Pathogenesis of Shigatoxin-associated hemolytic uremic syndrome. Pediatrics Research. 50(2): 163-171.
150. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. 2002. Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias. España: Acribia. 667 p.
151. Ray PE y Liu XH. 2001. Pathogenesis of shiga toxin-induced hemolytic uremic síndrome. Pediatr Nephrol. 16 (10): 823-39
152. Reyes-Rodríguez NE, Talavera M, Varela JA, Barba J, Gutiérrez AC, Alonso U. 2013. Prevalencia y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* O157:H7 aislada de canales de bovinos sacrificados en rastros del altiplano central Mexicano. Rev mex de cienc pecuarias 4(2): 235-242.
153. Riley LW, Remis RS, Helgeson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308(12): 681-685.
154. Rivas M, Caletti MG, Chinen I. 2003. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. Emerg Infect Dis. 9(9): 1184-1186.
155. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldan CD, Balbi L, García B. 2006. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. Food borne Pathog Dis. 3(1): 88-96.
156. Rocha RC, Lozano P, Martínez Y. 2005. Modelo de la patogénesis de las enfermedades infecciosas. Benemérita universidad autónoma de puebla. 251 p.

157. Roldán ML, Chinen I, Otero JL. 2007. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Rev Argent Microbiol. 39(2): 113-119.
158. Rodríguez-Ángeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. p 464-475.
159. Romero R. 2007. Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Editorial Médica Panamericana. p 753-766.
160. Ryu JH y Beuchat LR. 2005. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. Applied and Environmental Microbiology 71(1): 247-254.
161. Ryu JH, Kim H, Beuchat LR. 2004. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. J Food Prot. 67(10): 2123-2131.
162. Salvatierra G. 2015. Detección de *Salmonella spp.* En muestras de carcasas porcinas obtenidas en camales de Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 65 p.
163. Samadour M, Stewart J, Steingart K, Addy C, Louderback J, McGinn M, Ellington J, Newman T. 2004. Laboratory investigation of an *E. coli* O157:H7 outbreak associated with swimming in battle Ground Lake, Vancouver, Washington. J Environ Health. 64(10): 16-20.
164. Sandvig K, Grimmer S, Lauvrak SU, Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Iversen TG. 2002. Pathways followed by ricin and shiga toxin into cells. Histochem. Cell Biol. 117(2): 131-141
165. Schmidt H, Scheef J, Huppertz HI, Frosch M, Karch H. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H2 strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol. 37(11): 3491-3496.
166. Siegler RL, Pavia AT, Christofferson RD, Milligan MK. 1994. A 20-year population-based study of post diarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. Pediatrics. 94(1): 35-40.
167. Smith HW y Gyles CL. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J Med Microbiol. 3(3):387-401.
168. Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM, Holmes RK, O'Brien AD. 1988. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. J Bacteriol. 170(3):1116-1122.

169. Solomon EB, Yaron S, and Matthews KR. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization. *App Environ Microbiol.* 68(1): 397-400.
170. Taneike I, Wakisaka-Saito N, Harada HM, Zang T, Yamamoto T. 2000. The enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin genes of a Shiga toxin (Stx1) and Stx2 producing, serotype O128 *Escherichia coli* strain with a greatest hemolytic activity. *Acta Med Biol.* 48(1): 11-18.
171. Tarr PI, Tran TN, Wilson RA. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *J Food Prot.* 62(2): 133-139.
172. Terrance MA, Barkocy-Gallagher GA, Rivera-Betancourt M, Koohmaraie M. 2002. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl Environ Microbiol.* 68(10): 4847-4852.
173. Thanassi DG y Hultgren SJ. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Op Cell Biol.* 12(4):420-430.
174. Thomas KM, McCann MS, Collery MM, Logan A, Whyte P, McDowell DA, Duffy G. 2012. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. *Int J Food Microbiol.* 153(3): 288-296.
175. Tutenel AV, Pierard D, Van Hoof J, De Zutter L. 2003. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157 contamination routes in a cattle slaughterhouse. *J Food Prot.* 66(9): 1564-1569
176. Umoh JU. 2001. An overview of possible critical control points of ready-to-eat beef product of northern Nigeria. International conference on food and security, conference center Ibadan, Nigeria. p 109-115
177. Vadillo S, Piriz S, Mateos EM. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana de España. p 301-325.
178. Valencia C, Aguirre C, Petzold G, Reyes J, Luarte F y Vargas C. 2003. Efecto del lavado por aspersión con dióxido de cloro, ozono y kilol para reducir la contaminación bacteriana superficial de piezas cárnicas de bovino. *Alimentaria* 40(344): 17-22.
179. Varela G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota MI, González S, González G, Gugliada MJ, Carbonari CC, Algorta G, Bernadá M, Sabelli R, Pardo L, Rivas M, Schelotto F. 2008. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología.* 40(2): 93-100.
180. Varela-Hernández JJ, Cabrera E, Cardona MA, Ibarra LM, Rangel H, Castillo A, Torres MR, Ramírez A. 2007. Isolation and characterization of shiga toxin- producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *International Journal of Food Microbiology* 113(2): 237-241.

181. Vernozzy-Rozand C, Ray-Gueniot S, Ragot C, Bavai C, Mazuy C, Montet MP. 2002. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial mince beef. *Letters in Applied Microbiology* 35(1): 7–11.
182. Vidal JE, Canizalez-Román A, Gutiérrez J, Navarro-García F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud pública de México* 49(5): 376-386.
183. Villalobos L, Martínez R, Blanco A, Maldonado A, Bastardo J. 2008. Detección molecular de *Escherichia coli* productor de Shiga toxina (Stx1) y rotavirus en heces de niños con diarrea. *Invest Clin.* 49(3):387-395.
184. Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, Samuel JE, O'Brien AD. 1990. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun.* 58(2): 3959-3965.
185. Ware JM, Abbott SL, Janda JM. 2000. A new diagnostic problem: isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains with aberrant biochemical properties. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 38(3): 185-187.
186. Weagant SD, Bryant JJ, Bark DH. 1994. Survival of *E. coli* O157:H7 in mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *Journal of Food Protection* 57(7): 629–634.
187. Wells JG, Shipman LD, Greene KD. 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol.* 29(5): 985-989.
188. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R and Morris GK. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol.* 18(3): 512–520.
189. Werber D, Fruth A, Buchholz U, Prager R, Kramer MH, Ammon A, Tschape H. 2003. Strong association between shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes stx2 and eae as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22(12): 726–730.
190. WHO. 2007. Manual de procedimientos. Diagnóstico y caracterización de *E. coli* O157 productor de toxina shiga a partir de especímenes clínicos. Departamento de bacteriología. Instituto nacional de enfermedades infecciosas.
191. Wilks SA, Michels H, Keevil CW. 2005. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int J Food Microbiol.* 105(3):445-454.
192. Xiaodong X, Jianghong M, McDermott PF, Ayers S, Blickenstaff K, Tran TT, Abbott J, Zheng J and Zhao S. 2010. Presence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Other Potentially Diarrheagenic *E. coli* Strains in Retail Meats. *American Society for Microbiology* 76(6): 1709-1717.

193. *Zambrano AM. 2012. Implementación de un ensayo PCR multiplex para la identificación de las enterovariades de Escherichia coli patógenas. Tesis para obtener el título de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí: Univ de las fuerzas armadas. 73 p.*
194. *Zambrano H, Lucas J, Vilca M, Ramos D. 2013. Determinación de Salmonella spp.de centros de beneficio clandestino de pollos de engorde en Lima. Rev Inv Vet Perú 24(3): 337-345*
195. *Zamxaka M, Pironcheva G, Muyima NYO. 2004. Microbiological and physico-chemical assessment of the quality of domestic water sources in selected rural communities of the Eastern Cape Province, South Africa. Journal Home 30(3): 333-340.*
196. *Zhang W, Bielaszewska M, Thorsten K, Karch H. 2002. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in Escherichia coli strains isolated from humans. J Clin Microbiol. 40(4): 1441-1446.*